



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – CAMPUS ERECHIM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**  
**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**MARLUCI MARANGONI**

**EFEITO DA RADIAÇÃO MICRO-ONDAS SOBRE A ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO  
OLEICO CATALISADO PELA LIPASE NS-40116 LIVRE E ÁCIDO SULFÚRICO**

**ERECHIM**

**2019**

**MARLUCI MARANGONI**

**EFEITO DA RADIAÇÃO MICRO-ONDAS SOBRE A ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO  
OLEICO CATALISADO PELA LIPASE NS-40116 LIVRE E ÁCIDO SULFÚRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Clarissa Dalla Rosa e do Prof. Dr. Cláudio Dariva.

**ERECHIM**

**2019**

**MARLUCI MARANGONI**

**EFEITO DA RADIAÇÃO MICRO-ONDAS SOBRE A ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO  
OLEICO CATALISADO PELA LIPASE NS-40116 LIVRE E ÁCIDO SULFÚRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, campus Erechim, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Clarissa Dalla Rosa

Prof. Dr. Cláudio Dariva

Esta dissertação foi defendida e aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Clarissa Dalla Rosa - UFFS

---

Prof. Dr. Cláudio Dariva - UNIT

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gean Delise Leal Pasquali Vargas - UFFS

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Geciane Toniazzo Backes - URI

---

Prof. Dr. Elton Franceschi - UNIT

Erechim, Fevereiro de 2019

*Milagres não acontecem em contradição com a natureza,  
mas em contradição com o que sabemos sobre a natureza.*

***Santo Agostinho***

*A vida começa a cada manhã.*

***Joel Olsteen***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao término dessa jornada, não poderia deixar de lembrar e de agradecer àqueles que me ajudaram nesse processo, o qual, às vezes, pareceu interminável. Assim, deixo registrado aqui minha gratidão...

Em primeiro lugar a Deus, causa primeira de todas as coisas! Aos meus anjos e guias protetores, que sempre me mostraram o caminho do bem, do amor e da verdade.

Aos meus pais, pela presença constante em minha vida, meu porto seguro, meu apoio e meu refúgio. Obrigada por sempre estarem enviando energias positivas e não me deixarem desistir.

Aos meus irmãos, Dani e Lê e a minha grande amiga e cunhada Edi. Obrigada por estarem comigo sempre, cada um com seu carinho, e com sua preocupação particular, mas que nunca me deixaram sentir só. Vocês fazem parte de tudo isso.

A você Fê! Meu esposo, companheiro e grande responsável por eu ter concluído essa etapa. Obrigada por estar comigo em todos os momentos e, da sua maneira, me aconselhar e me compreender.

À professora Clarissa Dalla Rosa, que sempre foi muito mais que uma orientadora. Aprendi muito com você sobre este trabalho, mas principalmente sobre a vida, sobre o amor, sobre acreditar na verdade. Obrigada por todas as vezes que me ouviu, me aconselhou e me mostrou que o mais importante é sempre concentrar-se no melhor.

Ao professor orientador e grande amigo Cláudio Dariva. Obrigada pelo desafio feito e por acreditar que eu seria capaz de realizá-lo. És um profissional como poucos. Que honra a minha ter desfrutado do seu conhecimento profissional por alguns meses. Obrigada pelos conhecimentos de vida que tive com você.

As profes e grandes amigas Silvia Dariva e Juliana De Conto. Ter pessoas como vocês na vida, torna os dias muito melhores. Obrigada pela companhia nos dias em Aracaju e por todos os abraços e palavras de carinho.

Aos professores Elton Franceschi e Gustavo Borges. Obrigada pelas conversas, pelas sugestões, pelas visitas na unidade de trabalho para saber se estava dando tudo certo e também pelos “chimas” de todas as manhãs, que me deixavam mais perto de casa nos dias em Aracaju.

Aos colegas e amigos do NUESC – Aracaju. Obrigada pela maravilhosa recepção e por tornarem meus dias lá, uma extensão da minha casa. Certamente, amigos que estarão sempre comigo.

Ao bolsista de iniciação científica Wesler, pela parceria durante todo o período da pesquisa. Obrigada pelo seu interesse em entender cada parte desse trabalho e por estar comigo em todo o processo, realizando todas as atividades de forma correta e muito cuidadosa.

Aos colegas de mestrado, pelas conversas e pelas trocas de experiências. Obrigada pela contribuição de cada um durante todo o processo. Em especial, Camila Rutkoski, Débora Ferasso, Natani Macagnan e Suéllen Ferrazzo. Vocês estarão sempre em meu coração.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia ambiental da UFFS, pelos ensinamentos repassados e por toda a disponibilidade.

À minha grande amiga Angela Antunes, um ser de luz que foi colocado em meu caminho. Obrigada pela sua existência, pelo seu sorriso e, principalmente, pelos “chimas” e pelas conversas em torno deste trabalho. Saiba que sua contribuição foi extremamente importante, e os momentos vividos com você estão na memória deste trabalho.

À minha “mãe” postiça Sandra. Um presente de Deus, um exemplo de caráter, de dedicação e de coragem. Obrigada por ter começado tudo isso comigo, por não ter me deixado desistir e por me mostrar o quanto eu sou capaz de realizar tudo o que eu quiser.

Aos meus colegas de trabalho mais “Top’s”. Obrigada por sonharem esse sonho comigo e por auxiliarem da forma que foi possível na minha ausência. Certamente, sem vocês, teria sido mais difícil.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

Os ésteres de ácidos graxos são substâncias normalmente encontradas na natureza e são utilizados como intermediários na síntese orgânica de diversos produtos. São também obtidos a partir da esterificação de ácidos graxos com álcoois na presença de catalisadores. As reações de esterificação podem ser catalisadas por ácidos, bases ou por catálise enzimática. Um processo alternativo para esterificação, baseia-se no uso de irradiação microondas, uma tecnologia de fácil operação, econômica em termos de energia, com tempo de processamento reduzido, aquecimento extremamente rápido e menor relação álcool/óleo. A comparação reações de esterificação em batelada com aquecimento convencional e com aquecimento por aplicação da radiação micro-ondas monomodo são aspectos propostos neste trabalho. Neste contexto de inovação biotecnológica e de rotas de avanços industriais nesta área biocatalítica, este trabalho tem como objetivo avaliar o processo de esterificação de ácido oleico/álcool (etanol, 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol), utilizando catalisador químico (ácido sulfúrico) e enzimático (Lipase livre NS 40116), frente ao aquecimento convencional e micro-ondas. As reações de esterificação foram conduzidas utilizando os seguintes parâmetros: razão molar ácido oleico/álcool 1:6, 1% de catalisador químico, 2% de catalisador enzimático e 10% de água, temperatura de 45 °C em diferentes tempos reacionais. Nestas condições, o catalisador enzimático atinge níveis de consumo do ácido oleico superiores aos proporcionados pelo uso do catalisador químico utilizando etanol, sendo que após cerca de 2 horas de reação, 40% de ácido graxo foi consumido nas reações que utilizaram o catalisador enzimático e 10% naquelas catalisadas pelo sistema químico, sugerindo um melhor desempenho do catalisador enzimático para as condições reacionais investigadas sem o uso de micro-ondas. As reações em sistemas químicos e enzimáticos descritos anteriormente foram também realizadas em micro-ondas, onde se observaram que os catalisadores apresentam potencialidade de uso frente deste modo de aquecimento. Foram verificados resultados de ácido graxo residual de 93,9% para as reações enzimáticas e 86,8% utilizando o ácido sulfúrico como catalisador, ambas respostas obtidas em 120 minutos de reação com uso do etanol, empregando 20 W de potência, e temperatura de 45°C. Este estudo ainda apresenta as investigações acerca da radiação nos modos cíclicos e dinâmico, que indicaram que o modo dinâmico se apresentou ligeiramente superior ao modo cíclico e que isso se deve possivelmente à forma como a energia é desprendida nestes dois sistemas. O uso de micro-ondas sugere vantagens sobre os sistemas químicos e enzimáticos convencionais, principalmente quando se trata do tempo reacional, destacando-se pelas condições de temperatura e pelas potências amenas.

**Palavras-chave:** Esterificação, micro-ondas, ácido oleico, enzima, catálise química.

## ABSTRACT

Fatty acid esters are substances commonly found in nature and are used as intermediates in the organic synthesis of many products. They are also obtained by the esterification of fatty acids with alcohols in the presence of catalysts. The esterification reactions can be catalysed by acids, bases or by enzymatic catalysis. An alternative process for esterification is based on the use of microwave irradiation, a technology that is easy to operate, economic in terms of energy, with reduced processing time, extremely fast heating and lower alcohol/oil ratio. The comparison of conventional batch processes with the application of single mode microwave irradiation are aspects proposed in this work. In the context of biotechnological innovation and industrial advances in biocatalytic area, this study aims to evaluate the esterification of oleic acid/alcohol (ethanol, 1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol), using an chemical (sulfuric acid) and enzymatic catalyst (free Lipase NS 40116) against microwave single mode radiation. Esterification reactions were conducted using the following parameters: 1:6 oleic acid / alcohol molar ratio, 1% chemical catalyst, 2% enzymatic catalyst and 10% water, temperature of 45 ° C at different reaction times. Under these conditions, the enzymatic catalyst reaches levels of oleic acid consumption higher than those provided by the use of the chemical catalyst, and after about 2 hours of reaction, 40% of the fatty acid was consumed at the reactions using chemical catalyst, and 10% in those catalyzed by the enzymatic system, suggesting a better performance of the enzymatic catalyst for the reactional conditions investigated without the use of microwaves. The reactions in chemical and enzymatic systems described above were also carried out in microwaves, where it was observed that the catalysts present potential of use against the use of this irradiation. Residual fatty acid results of 93,9% for the enzymatic reactions and 86,8% for sulfuric acid as catalyst, both responses obtained in 120 minutes of reaction, using 20 W of ultrasonic power, at 45 ° C. This study still presents the investigations about cyclic and dynamic modes of irradiation, which indicated that cyclic mode was slightly superior than dynamic mode, probably due to the way the energy is released in these two systems. The use of microwaves suggests advantages over conventional chemical and enzymatic systems, especially when it comes to the reaction time, being distinguished by temperature conditions and mild power.

**Keywords:** Esterification, microwaves, oleic acid, enzyme, chemical catalysis.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS .....	16
1.1.1	Objetivo geral.....	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1	LIPASES .....	18
2.1.1	Lipase NS-40116.....	20
2.2	ESTERIFICAÇÃO ÁCIDO OLEICO VIA ENZIMÁTICA.....	18
2.3	ESTERIFICAÇÃO ÁCIDO OLEICO VIA CATÁLISE QUÍMICA.....	21
2.4	IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS.....	22
2.4.1	Princípios teóricos.....	23
2.4.2	Efeitos térmicos e não térmicos.....	25
2.4.3	Aplicações .....	25
2.5	ESTADO DA ARTE .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>29</b>
3.1	MATERIAIS .....	30
3.2	UNIDADES EXPERIMENTAIS .....	31
3.2.1	Reator convencional <i>Shaker Equilam</i> .....	31
3.2.2	Reator micro-ondas monomodo.....	32
3.3	MÉTODOS.....	33
3.3.1	Fluxograma das atividades desenvolvidas .....	Erro! Indicador não definido.
3.3.2	Esterificação de ácido oleico utilizando lipase .....	33
3.3.3	Esterificação de ácido oleico utilizando catalisador químico .....	34
3.3.4	Esterificação de ácido oleico em micro-ondas monomodo.....	34
3.3.5	Determinação da atividade enzimática (AE) .....	35
3.3.6	Determinação de ácidos graxos livres (AGL) .....	36
3.3.7	Determinação da energia total utilizada no micro-ondas .....	37
3.3.8	Estudo de diferentes álcoois nas reações de esterificação.....	Erro! Indicador não definido.
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSões.....</b>	<b>39</b>
4.1	ESTERIFICAÇÃO COM CATÁLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA EM MÉTODO CONVENCIONAL .....	39

4.2	ESTUDO DO MICRO-ONDAS SOBRE A CATÁLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA .....	41
4.3	ESTUDO DA IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS NOS MODOS CÍCLICO E DINÂMICO.....	42
4.4	ESTUDOS DE DISTINTOS ÁLCOOIS .....	45
<b>4.4.1</b>	<b>Catálise química.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Catálise enzimática.....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
	<b>APENDICES .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações catalisadas pela enzima lipase.....	198
Figura 2 – Estrutura cristalina de alta resolução da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> , Protein Data Bank (a)-PDB ID: 1DT3; (b)-PDB ID: 4ZGB).....	20
Figura 3 - Vista do Shaker (Equilan) utilizado para as reações de esterificação química e enzimática do ácido oleico empregando aquecimento convencional. ....	311
Figura 4 – Vistas do reator micro-ondas monomodo (CEM, modelo Discover) utilizado para as reações de esterificação química e enzimática do ácido oleico empregando irradiação micro-ondas .....	322
Figura 5 – Perspectiva da energia das micro-ondas direcionada na amostra, nos modos cíclico e dinâmico. ....	332
Figura 6 – Fluxograma evidenciando as atividades realizadas na dissertação para análise da esterificação de ácido oleico em aquecimento convencional e micro-ondas. ....	293
Figura 7 – modelo da curva de titulação potenciométrica de um ácido forte e um fraco.....	377
Figura 8 – Conversão de ácido oleico residual em função do tempo com aquecimento convencional, com distintos catalisadores.....	399
Figura 9 – Comparação do tipo de catalisador sobre a cinética de consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol empregando irradiação micro-ondas. ....	411
Figura 10 – Comparação dos modos de operação das micro-ondas com método convencional sobre a cinética de consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol, empregando catalisador químico. ....	423
Figura 11 – Energia total aplicada nas amostras pelos métodos dinâmicos e cíclicos do equipamento CEM discover. ....	434
Figura 12 – Ácido graxo residual em função do tempo nos métodos, convencional, micro-ondas cíclico e micro-ondas dinâmico, com catálise enzimática. ....	444
Figura 13 – Esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, empregando catalisador químico, sob aquecimento convencional.....	466
Figura 14 – Efeito das micro-ondas na esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, durante o período de 30min e 90 min empregando catalisador químico, sob aquecimento micro-ondas. ....	477
Figura 15 – Estudo comparativo dos métodos convencional e micro-ondas em 30min (a) e 90min (b), empregando catalisador químico. ....	488

Figura 16 – Esterificação de ácido oleico com distintos álcoois na presença de hexano em 30 minutos de reação empregando catalisador químico em aquecimento micro-ondas.....	499
Figura 17 – Esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, empregando catalisador enzimático, sob aquecimento convencional, em diferentes tempos reacionais. ....	50
Figura 18 – Efeito das micro-ondas na esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, em diferentes tempos reacionais, empregando catalisador enzimático. ....	511
Figura 19 – Estudo comparativo dos métodos convencional e micro-ondas em 30min (a) e 90min (b), empregando catalisador enzimático.....	511
Figura 20 – Solubilidade do meio reacional submetido ao efeito das micro-ondas sem adição de hexano (a), com distintos álcoois na presença de hexano (b). ....	522
Figura 21 – Efeito das micro-ondas na esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, na presença de hexano no meio reacional, empregando catalisador enzimático.....	533

## **LISTA DE ABREVIACÕES E UNIDADES**

PI – Ponto Isoelétrico

AE – Atividade Enzimática

AGL – Ácidos Graxos Livres

% – Porcentagem

h – Hora

min – Minuto

> – Maior

°C – Graus Celsius

mL – Mililitro

g – Gramas

rpm – Rotações por minuto

W – Watt

GHz – Gigahertz

## 1 INTRODUÇÃO

Os ésteres de ácidos graxos são substâncias normalmente encontradas na natureza e são utilizados como intermediários na síntese orgânica de diversos produtos, como solventes, aromas, medicamentos, sabões, perfumes, cosméticos, lubrificantes e na produção de biocombustíveis, entre outros. Dentre os ésteres de interesse comercial, o oleato de etila é frequentemente usado como biodiesel, aditivo de combustível diesel e nas indústrias de cosméticos, farmacêuticas e de alimentos (BLOOMER *et al.*, 1992; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998; FORESTI; FERREIRA, 2005; MADALOZZO *et al.*, 2014; XING *et al.*, 2016; ABCHA *et al.*, 2019; MELLO *et al.*, 2017; PRICHARD *et al.*, 2017;).

Os ésteres de cadeia longa são também obtidos a partir da esterificação de ácidos graxos com álcoois na presença de catalisadores. Independentemente do catalisador escolhido, o tipo de álcool empregado na esterificação de ácidos de cadeia longa resulta na produção de compostos com variadas aplicações. Por exemplo, no emprego de etanol ou de metanol pode resultar em biocombustíveis. O uso de butanol na esterificação resulta em ésteres com aplicações em aromas, em materiais impermeabilizantes e lubrificantes, ao passo que álcoois maiores como hexanol e octanol levam à produção de ceras e de lubrificantes especiais de uso na indústria farmacêutica e cosmética (SANTOS *et al.*, 2015). A literatura ainda é escassa em estudos que avaliem de forma sistêmica o efeito do tipo de álcool na esterificação de ácidos graxos de cadeia longa.

As reações de esterificação podem ser catalisadas por ácidos, por bases ou por enzimas. O processo catalítico convencional da esterificação de ácidos graxos consiste na catálise homogênea, com ácido mineral forte (ácido sulfúrico ou clorídrico, entre outros), o qual permanece dissolvido no meio de reação e deve ser removido ao final da reação por lavagem alcalina. Catalisadores ácidos heterogêneos como óxidos metálicos e resinas podem também ser empregadas no processo de transformação dos ácidos graxos em ésteres (KANDA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018). Os processos envolvendo catálise heterogênea, em geral, demandam grandes quantidades de energia, além de serem lentos (ABBAS; COMEAU, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; LAM; LEE; MOHAMED, 2010).

Na catálise enzimática, as lipases vêm ganhando espaço e sendo muito utilizadas devido à sua grande disponibilidade e ao custo cada vez mais acessível. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente ampla, são muito estáveis

neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem ainda, a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar, com alta especificidade (GANDHI *et al.*, 1997; PANDEY *et al.*, 1999; MARTÍNEZ-RUIZ *et al.*, 2018).

Um processo alternativo para produção de ésteres baseia-se no uso de irradiação micro-ondas. A literatura indica como características favoráveis de tal tecnologia a facilidade de operação, economia de energia, tempo de processamento reduzido, aquecimento extremamente rápido e menor relação álcool/óleo (LEADBEATER; STENCEL, 2006; CHOEDKIATSAHUL *et al.*, 2015; KHAN, 2018). Alguns trabalhos já têm tratado da transesterificação em micro-ondas com excelentes rendimentos (>90%) e impressionantes níveis de pureza (>99%), sem precisar empregar temperaturas e com tempos reacionais similares (AZCAN; DANISMAN, 2007; HERNANDO *et al.*, 2007) ou inferiores aos empregados no aquecimento convencional (DAHAI, 2010; OSUNA, 2012; DA RÓS, 2013; CHOEDKIATSAHUL *et al.*, 2015). Outros autores já utilizam suportes para os catalisadores, aumentando ainda mais a reatividade do sistema, alguns utilizam suportes sólidos (PERIN *et al.*, 2008; MAHESH *et al.*, 2015; TANGY *et al.*, 2017) ou suportes líquidos como é o caso dos líquidos iônicos (XIAO *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2017; DING *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; ULLAH *et al.*, 2018), ou até mesmo combinados (ARFAN; BAZUREAU, 2005; ZHEN *et al.*, 2014; PAN *et al.*, 2019).

Um reator micro-ondas comercial é composto por três componentes principais: fonte geradora de radiação micro-ondas; aplicador, cavidade onde a energia é transferida aos materiais, e guia de onda, que exerce a função de transferência da energia micro-ondas da fonte geradora à cavidade. As cavidades podem ser classificadas, geralmente, como monomodo (radiação projetada diretamente num ponto específico no reator) e multimodo (radiação distribuída dentro do reator), sendo definido o tipo de cavidade utilizada em função do material a ser processado (KHAN, 2018).

Ésteres metílicos de ácidos graxos foram sintetizados a partir de óleo de soja e de metanol a uma temperatura de 40 °C na presença de álcool terc-amílico como solvente. Sob micro-ondas, 94% de conversão foi observada em 12h, enquanto o método convencional exigiu 24h para atingir a mesma conversão (DAHAI, 2010). A produção de ésteres, a partir de óleo de palma, com o uso de irradiação de micro-ondas,

foi investigada por Choedkiatsahul *et al.* (2015). Verificou-se a produção de éster com teor de 99,4%, em um tempo reacional de 1,75 min, a 70 °C e a 1% de NaOH.

Na síntese biocatalítica, problemas relacionados à taxa de reação lenta, longo período reacional e baixa conversão podem ser solucionados com a aplicação de micro-ondas. A irradiação de micro-ondas proporciona um aquecimento elevado de forma pontual que, por sua vez, provoca o aumento da taxa de reação e, consequentemente, reduz expressivamente o tempo de síntese. Ainda, a irradiação micro-ondas exerce maior influência sob moléculas polares com elevado momento dipolo, como lipases e substratos utilizados na síntese enzimática que apresentam natureza polar. Tais moléculas apresentam uma tendência superior em absorver a energia das micro-ondas, em relação às moléculas com menor momento dipolo. Sendo assim, a irradiação micro-ondas pode facilitar a aproximação do substrato ao sítio ativo da enzima, ou seja, aumentando a possibilidade de interação efetiva do substrato com o biocatalisador (KHAN; RATHOD, 2018).

A comparação de processos de batelada convencional com modos de aplicação da irradiação micro-ondas monomodo são aspectos propostos neste trabalho. Neste contexto de inovação biotecnológica e de rotas de avanços industriais nesta área biocatalítica, optou-se por fazer o estudo para a avaliação comparativa entre o processo de catálise convencional e enzimática, nas reações de esterificação (ácido oleico/etanol) com emprego de ácido sulfúrico e enzima lipase.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o processo de esterificação de ácido oleico com diferentes álcoois, utilizando catalisadores químicos e enzimáticos, frente ao aquecimento convencional e micro-ondas.

Para alcançar o objetivo proposto neste trabalho, os seguintes objetivos específicos estão contemplados.



### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Comparar catalisadores em modo convencional com etanol.
- Comparar sistemas de aquecimento para esterificação com ácido sulfúrico e enzima NS-40116 livre com etanol.
- Comparar modo de aplicação das micro-ondas na reação de esterificação com ácido sulfúrico e enzima NS-40116 livre com etanol.
- Comparar diferentes álcoois na reação de esterificação com micro-ondas via enzimática e química.
- Comparar métodos convencional e micro-ondas para os diferentes álcoois, via catálise química e enzimática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, são abordados temas referentes à esterificação de ácido oleico com etanol, catalisada por  $H_2SO_4$  e NS-40116 em meio convencional e em micro-ondas, frente a diferentes modos de operação, cíclico e dinâmico, bem como, o uso de distintos álcoois.

### 2.1 ESTERIFICAÇÃO ÁCIDO OLEICO VIA ENZIMÁTICA

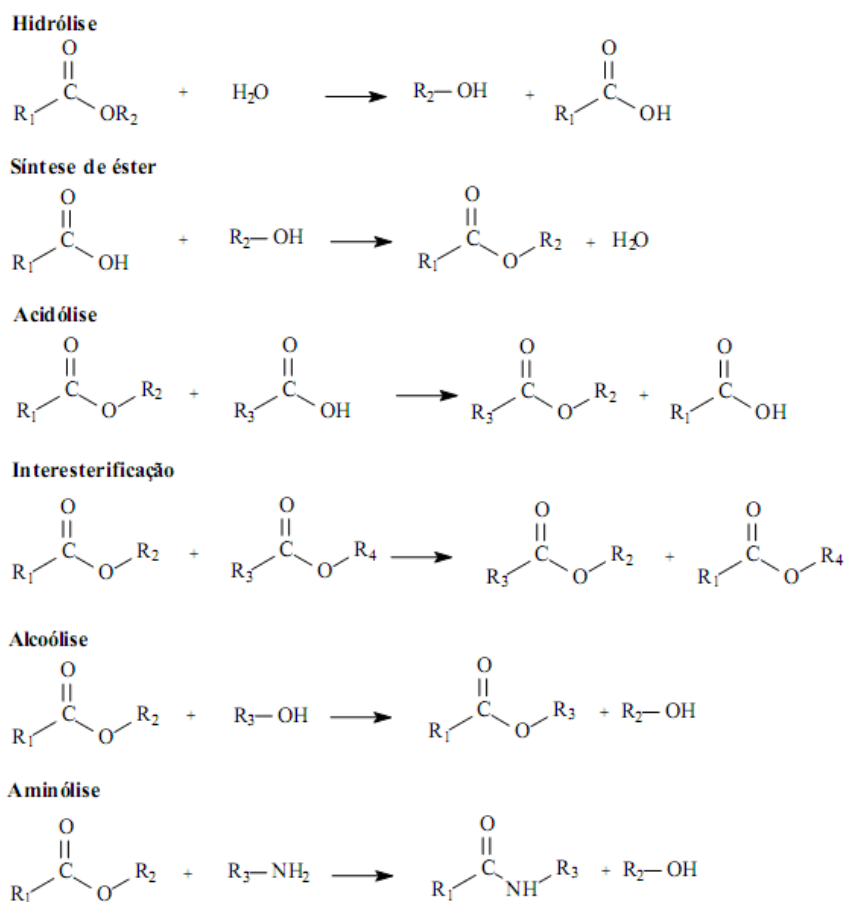
A reação de esterificação consiste na obtenção de ésteres a partir da reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), com formação de água como subproduto. A reação de esterificação pode ser catalisada por ácidos de Brønsted ou de Lewis, por bases de Lewis, além de enzimas (LEÃO, 2009; SANTOS, 2012; SMITHMAITRIE; PRATEEPCHAIKUL, 2013; TACCA *et al.*, 2014; SOMNUK).

A esterificação catalisada por enzimas adquiriu atenção em muitas aplicações, devido à sua importância industrial, especialmente nas atividades que envolvem emprego de ésteres orgânicos, como na biotecnologia e na indústria química (TORRES; CASTRO, 2004). Alguns fatores influenciam o rendimento do éster, como as concentrações de enzima e de substratos, razão molar, temperatura da reação, teor de água (ZAKS; KLIBANOV, 1988; SILVA *et al.*, 2018b; STERGIOU, 2013).

#### 2.1.1 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) constituem uma das classes mais conhecidas de enzimas e são classificadas como hidrolases, cuja principal função biológica é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, insolúveis em ácidos graxos livres, mono, diacilgliceróis e glicerol. Além da sua função natural, as lipases podem catalisar uma série de reações, como por exemplo alcoólise, hidroesterificação, esterificação e transesterificação (Figura 1) (BROCKMUN; MOMSEN; TSUJITA, 1988; FREIRE, 1996; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SAYLOR; LOVE, 2016; LI *et al.*, 2019).

Figura 1 – Reações catalisadas pela enzima lipase.



Fonte: VILLENUEVE *et al.* (2000).

As lipases podem ser encontradas em diversas espécies de animais, de plantas, de fungos e de bactérias. As formulações produzidas por micro-organismos são as mais utilizadas, devido, principalmente, aos menores custos de produção, às facilidades operacionais, à maior estabilidade térmica, à fácil modificação de suas estruturas e aos maiores rendimentos (BROCKMN; MOMSEN; TSUJITA, 1988; SANTOS, 2016).

Algumas características das lipases fazem com que as mesmas apresentem vantagens significativas para aplicações em processos industriais em diferentes setores. As lipases são enzimas estáveis e atuam em uma ampla faixa de pH, possuem elevada especificidade, não requerem cofatores, exigem condições menos brandas e requerem, dessa forma, menor gasto energético nos processos industriais, apesar de também serem estáveis a altas temperaturas quando se faz necessário e são aplicáveis a uma diversificada gama de materiais, devido à sua capacidade de reagir e de tolerar

condições diversas (HASAN *et al.*, 2006; FAN; QIAN, 2010; HORCHANI, 2012, ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

As lipases se destacam entre as hidrolases em função das suas inúmeras aplicações, sendo usadas em indústrias de produtos de higiene e de limpeza, de medicamentos, de alimentos (panificação, lácteos, carnes, bebidas, por exemplo), têxteis, de papel e de celulose, de curtumes, de cosméticos, de biossensores e de tratamento de resíduos. É comum o uso das lipases em alimentos, na produção de ácidos graxos essenciais, como ácido linolênico e  $\alpha$ -linolênico, assim como para reações de desacetilação da quitosana e de produção de oligossacarídeos (MESSIAS *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2012; SANTOS, 2016).

A reação da lipase com o substrato ocorre na camada lipídio/água, sendo o sítio ativo composto, principalmente, de uma tríade de aminoácidos, contendo serina, histidina e aspartato. Esse sítio ativo é protegido por uma estrutura helicoidal oligopeptídica, que forma uma “tampa”, que se desloca quando a lipase se liga à interface lipídica, abrindo caminho para o substrato (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; TORRES, 2017).

### 2.1.2 Lipase NS-40116

A enzima microbiana lipase NS-40116 ou Callera trans L® (Novozymes) é proveniente do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* (PRICE *et al.*, 2014; 2016). Por apresentar estabilidade à temperaturas de 40-60°C, e atividade em pH alcalino, próximo de 9, e ser comercializada como uma formulação líquida, faz com que seu uso seja desejável para diversos processos industriais (FERNANDES *et al.*, 2004; PETERSEN; FOJAN; PETERSEN, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2011; TORRES, 2017).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é um monômero, com 269 aminoácidos, massa molecular 31,700 g/mol e ponto isoelétrico (pI) de 4,4. Ela possui forma estrutural esférica, de dimensões 35Å x 45Å x 50Å, e uma pequena  $\alpha$ -hélice (86 a 93 aminoácidos) como “tampa”. Como lipase, seu sítio ativo é composto de uma tríade catalítica Serina-Histidina-Aspartato, e possui, na “tampa”, um resíduo de triptofano (RODRIGUES *et al.*, 2009; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; TORRES, 2017). A Figura 2 apresenta a estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus* obtida por análise de cristalografia por método e difração de raio-X em forma de monômero (a) e dímero (b) (TORRES, 2017)

Alguns autores têm feito estudos, utilizando a lipase NS-40116 na sua forma livre para produção de biodiesel. Santos (2016), ao produzir ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto com a lipase NS-40116 livre, observou que a enzima é capaz de esterificar os ácidos graxos livres presentes na matéria. Cesarine, Dias e Nielsen (2013) observaram altas taxas de transesterificação e atividade de esterificação com o uso desta lipase. No estudo de Silva *et al.* (2018a), avaliou-se o uso da lipase NS-40116 para catalisar a transesterificação da gordura abdominal de frango. Os autores verificaram uma conversão de 77% com 0,3% da enzima, 2% de água, razão molar de metanol de 1:4,5, 30 e 250 rpm em 24h. Assim, verifica-se que a enzima NS-40116, apresenta potencial para uso em reações de esterificação, com aquecimento convencional e micro-ondas.

Figura 2 – Estrutura cristalina de alta resolução da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, Protein Data Bank (a)-PDB ID: 1DT3; (b)-PDB ID: 4ZGB).



Fonte: BRZOZOWSKI *et al.* (2000) e KUMAR *et al.* (2015).

## 2.2 ESTERIFICAÇÃO ÁCIDO OLEICO VIA CATÁLISE QUÍMICA

O processo da reação de esterificação é reversível, obtendo como produto principal, um éster específico. Entre os diversos métodos que podem ser utilizados para sintetizar os ésteres, um bom exemplo é a reação de esterificação de Fischer e Speier (1895), na qual, sob aquecimento, um ácido carboxílico reage com um álcool, produzindo éster e água. Essa reação, quando processada em temperatura ambiente, é

lenta, mas pode ser acelerada com o emprego de aquecimento e/ou com catalisador (exemplo, o ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

A reação de esterificação consiste na reação de um ácido graxo com um álcool na presença de um catalisador ácido. Os catalisadores homogêneos, usualmente ácidos minerais fortes, apresentam excelentes rendimentos reacionais. Para ser possível que sólidos ácidos possam ser utilizados como catalisadores em processos industriais é necessário que eles apresentem estabilidade nas condições operacionais, resistência térmica e mecânica, alta área superficial específica e elevada atividade e seletividade. Assim sendo, são encontrados, na literatura, trabalhos abordando diversos sólidos, como: zeólitas, óxidos sulfatados e catalisadores à base de carbono, inclusive oriundos de biomassa. Muitos destes estudos visam aumentar a estabilidade e melhorar as propriedades texturais destes materiais, assim como também desenvolver novos sólidos que possam vir a ser usados como catalisadores heterogêneos eficientes (PEREIRA, 2004; CHOUHAN; SARMA, 2011; LIU *et al.*, 2013; LIU; MELERO *et al.*, 2014; WEN; CUI, 2015; MAO *et al.*, 2018; WANG; FANG; ZHANG, 2019).

Apesar de os catalisadores heterogêneos apresentarem vantagens em relação aos catalisadores homogêneos, ainda são necessários estudos, considerando que estes, apresentam baixa atividade, requerem condições extremas em relação ao rendimento e ao tempo da reação (ZHANG *et al.*, 2010)

## 2.3 RADIAÇÃO MICRO-ONDAS

A radiação de micro-ondas consiste em ondas eletromagnéticas com comprimento de onda de 1mm a 1m e com frequência correspondentes entre 300 GHz e 300 MHz (THOSTENSON; CHOW, 1999; HORIKOSHI *et al.*, 2018). A fonte, as linhas de transmissão e o aplicador, são os principais componentes do micro-ondas. A fonte gera a radiação eletromagnética, e as linhas de transmissão fornecem a energia eletromagnética da fonte do aplicador e, no aplicador, a energia é absorvida ou refletida pelo material (THOSTENSON; CHOW, 1999; SANTOS, 2017).

A energia liberada pela radiação de micro-ondas é insuficiente para quebrar uma ligação química e, conseqüentemente, para promover modificações químicas nos compostos. A eficiência do aquecimento por micro-ondas está ligada às propriedades dielétricas, ou seja, na capacidade de um material em absorver a energia de micro-ondas e convertê-la em calor, na profundidade da penetração da radiação, da frequência e do

modo de operação (monomodo e multimodo) (CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2012).

Em reatores monomodo, a radiação de micro-ondas é gerada por um único magnetron e direcionada para a cavidade do reator onde a amostra está localizada. Essa cavidade é colocada no ponto em que a energia de micro-ondas é maximizada. A radiação interage com a amostra através de um campo eletromagnético relativamente homogêneo, que possui alta intensidade de potência. A configuração de modo único exige uma pequena cavidade de aplicação de micro-ondas, promovendo assim um campo de alta densidade de micro-ondas que interage com a amostra.

Por outro lado, os reatores de micro-ondas multimodo têm, geralmente, cavidades maiores. Neste sistema, um ou mais magnetrons geram o campo de micro-ondas, que é conduzido por uma guia de ondas e distribuído aleatoriamente por um agitador e, conseqüentemente, a radiação interage com a amostra de forma caótica. A configuração multimodo gera múltiplas regiões com altos e baixos níveis de intensidade de energia, o que resulta em um perfil de aquecimento de amostra heterogêneo. Para superar essa desvantagem, as amostras são mantidas sob rotação constante para fornecer uma distribuição de energia igual. Neste sentido, espera-se que os reatores monomodo, promovam uma aplicação de micro-ondas mais eficiente. No entanto, uma vez que o modo multimodo é menos sensível à geometria ou à posição do material, é tomado como o mais versátil (SANTOS, 2013).

### **2.3.1 Princípios teóricos**

O conhecimento de parâmetros ou de aspectos fundamentais da cinética de aquecimento é de extrema importância, para conduzir a busca por condições operacionais mais favoráveis, que otimizem o processo com micro-ondas, pois os fatores abaixo influenciam diretamente no estudo do presente trabalho.

#### **2.3.1.1 Propriedades dielétricas**

Conceitualmente a constante dielétrica,  $\epsilon'$ , representa a habilidade do material em armazenar a energia fornecida pela radiação micro-ondas incidente. A constante de perda dielétrica,  $\epsilon''$ , está relacionada a eficiência na qual aquela energia absorvida é transformada em calor. A razão entre a constante de perdas e a constante dielétrica é

conhecida como tangente de perdas. A habilidade de um material em converter energia eletromagnética em calor a uma dada temperatura e frequência de radiação é determinada pelo valor da tangente de perdas. Isso permite comparar a eficiência de diferentes materiais em gerar calor a partir da aplicação de radiação micro-ondas (KAPPE *et al.*, 2009).

#### 2.3.1.2 Profundidade de penetração

A profundidade de penetração da radiação micro-ondas nos materiais é definida como a profundidade na qual a magnitude da energia incidente decai a metade de seu valor na superfície do material (BRADSHAW *et al.*, 1998). Segundo estes autores, ao gerar aquecimento a partir de radiação com maiores comprimentos de onda, tal qual a frequência de rádio, a profundidade de penetração é grande. Essa vantagem garantiria um aquecimento uniforme do material processado. Entretanto, para a frequência de 2,45 GHz comumente usada na aplicação de micro-ondas, a profundidade de penetração da radiação é muito pequena, ocorrendo, na maioria das vezes, ser menor que o material processado. Esse fato resulta em um aquecimento altamente heterogêneo.

#### 2.3.1.3 Frequência de operação

Todos os fornos micro-ondas domésticos e a grande maioria dos reatores micro-ondas dedicados e produzidos comercialmente operam na banda de frequência de 2,45 GHz, que corresponde a 12 cm de comprimento de onda. Isso ocorre, principalmente, para que se evite gerar interferência nas telecomunicações, nas redes *wireless* e nas linhas telefônicas. Ademais, para fins domésticos, essa frequência é considerada ótima, uma vez que o magnetron gerador de radiação nessa frequência pode ser produzido a baixo custo. Entretanto, para aplicação laboratorial e/ou industrial, essa banda de frequência não pode ser considerada como a mais indicada. Tem-se como exemplo o aquecimento *via* micro-ondas da água, que possui frequência de ressonância de 18 GHz e, portanto, apresentaria maior eficiência da conversão de energia micro-ondas em energia térmica em outra faixa de frequência (BILECKA; NIEDERBERGER, 2010).

#### 2.3.1.4 Modo de aplicação monomodo



No processo de irradiação monomodo, as cavidades são projetadas para direcionar as micro-ondas precisamente na amostra. Para isto, elas possuem formato especial com seção transversal circular ou retangular (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2011). Seu tamanho é da ordem de um comprimento de onda, aproximadamente. Essas cavidades requerem uma fonte de radiação que tenha pouca variação na frequência de saída. A distribuição do campo eletromagnético não é uniforme, mas previsível por meio de técnicas analíticas ou numéricas (THOSTENSON; CHOU, 1999).

A utilização de cavidades monomodo permite definir posições precisas nas quais a intensidade do campo elétrico é máxima. Este tipo de cavidade tem a vantagem de garantir uma aplicação mais eficiente da energia micro-ondas. Entretanto, ela pode apresentar diferenças significantes de sua eficiência ao variar o volume de material processado (STUERGA; DELMOTTE, 2002).

### **2.3.2 Efeitos térmicos e não térmicos**

Os efeitos térmicos gerados pelo processamento *via* micro-ondas surgem das diferentes características entre o aquecimento dielétrico e convencional. No sistema convencional, a transferência de calor ocorre da superfície para o interior da amostra através de correntes de condução e de convecção. As taxas de aquecimento são reduzidas e dependem da condutividade térmica do material. Já para o aquecimento dielétrico, o aquecimento se dá rapidamente e de maneira volumétrica, do centro do material para a sua superfície (DE LA HOZZ, *et al.*, 2005; FORTUNY *et al.*, 2008; SANTOS, 2013).

Além dos efeitos térmicos, existem indicações da existência de efeitos não térmicos quando utilizado o aquecimento micro-ondas. Este provocaria a alteração de propriedades termodinâmicas do sistema submetido à radiação. Teoricamente estas implicações decorrem da interação direta do campo elétrico com moléculas específicas ou em estado de transição no meio reacional. Podendo ainda favorecer a eficiência das colisões moleculares devido à orientação das moléculas polares envolvidas na reação. Entretanto, a literatura está repleta de relatos conflitantes relacionados à existência desses efeitos não térmicos (KAPPE; DALLINGER, 2006; FORTUNY *et al.*, 2008).

### **2.3.3 Aplicações**

Diversas aplicações quanto ao uso de micro-ondas são encontradas nas diferentes áreas da indústria. Alguns dos estudos encontrados na literatura a respeito do tema, estão descritos neste item do presente trabalho.

Segundo Santos (2013), no estudo da quebra de emulsões de petróleo regido pelos mecanismos de condução e de convecção, o aquecimento convencional mostrou-se lento e ineficiente em comparação à radiação micro-ondas, havendo vantagem do aquecimento multimodo sobre o monomodo.

Estudos para a produção de biodiesel a partir de resíduos de óleo de cozinha com ácidos graxos livres utilizado na reação de esterificação assistida por micro-ondas onde Yin *et al.* (2013), obteve mais de 90% de conversão da esterificação alcançada em 7h por aquecimento por micro-ondas, enquanto que levou cerca de 12h por aquecimento convencional.

Yu *et al.* (2010), quando se fez o estudo dos ésteres metílicos de ácidos graxo em que foram sintetizados a partir de óleo de soja e de metanol a uma temperatura de 40 °C na presença do álcool terc-amílico como solvente. Por micro-ondas, 94% de conversão foi observada em 12h, enquanto o método convencional exigiu 24h para atingir a mesma conversão.

A síntese biocatalítica do biodiesel por transesterificação de óleo de palma e de álcool de cadeia curta como o etanol foi realizada usando lipase imobilizada por *Pseudomonas fluorescens* sob um sistema de aquecimento por micro-ondas. Uma conversão de 97,56% foi observada em 12 h de reação. Valor este seis vezes maior do que a conversão observada em um sistema de agitação mecânica (DA RÓS *et al.*, 2013). Na síntese de ésteres de ácido láurico usando *Novozym 435*, o aquecimento convencional requereu 24h, enquanto a reação foi completada em apenas 8min sob o sistema de micro-ondas (OSUNA, 2012). Porém, a literatura ainda é bastante escassa em trabalhos que foquem o modo de operação do micro-ondas sobre a reação de esterificação, seja química ou enzimática.

Saifuddin *et al.* (2009), ao fazer um estudo de um método híbrido para a síntese de biocombustíveis, foi combinada a hidrólise enzimática com a esterificação catalisada por ácido. Na hidrólise enzimática, foram utilizados o particionamento trifásico (TPP) e a secagem em micro-ondas para melhorar a atividade e a estabilidade das enzimas. A enzima tratada foi ainda utilizada para a hidrólise do óleo de cozinha residual a 40°C num meio bifásico. Observou-se que a atividade enzimática foi melhorada em 1,6 vezes com micro-ondas, em comparação com a técnica convencional. Assim, a energia de

micro-ondas pode melhorar significativamente as conversões em um curto período de tempo em comparação com o aquecimento convencional.

Santos (2013), observou no estudo da quebra de emulsões de petróleo, em que o aquecimento monomodo necessitou de menores quantidades de energia que o aquecimento multimodo para atingir a mesma temperatura e/ou eficiência de separação. Este comportamento também foi verificado no estudo de Santos *et al.* (2017) que avaliou a eficiência de quebra de emulsão de água em óleo bruto, pela aplicação de micro-ondas (multimodo e monomodo). A utilização de cavidades monomodo permite definir posições precisas nas quais a intensidade do campo eletromagnético é máxima. Este tipo de cavidade tem a vantagem de garantir uma aplicação mais eficiente da energia micro-ondas. Entretanto, ela pode apresentar diferenças significantes de sua eficiência ao variar o volume de material processado. Por outro lado, os reatores de micro-ondas multimodo que possuem cavidades maiores, contam com a interação radiação x amostra, de uma maneira caótica, gerando regiões com altos e baixos níveis de intensidade de energia, o que resulta em um perfil de aquecimento heterogêneo da amostra. Neste sentido, espera-se que reatores com cavidade monomodo, promovam uma aplicação de micro-ondas mais eficiente (STUERGA; DELMOTTE, 2002; SANTOS *et al.*, 2017).

## 2.4 ESTADO DA ARTE

A revisão da literatura realizada durante a execução deste trabalho mostrou que até onde se tem conhecimento as publicações que tratam do efeito da radiação micro-ondas sobre a esterificação de ácido oleico no processo catalítico enzimático são quase inexistentes.

Nos últimos anos, o aquecimento por micro-ondas tem atraído interesse como um método eficaz para aumentar as taxas de reações e, em alguns casos, melhorar os resultados da reação. O método de aquecimento também tem sido usado com sucesso na síntese peptídica e química. Aspecto do aquecimento por micro-ondas que tem levantado um debate significativo são as origens dos diferentes resultados das reações efetuadas por micro-ondas ou por aquecimento convencional. Para essas discussões, o efeito específico das micro-ondas foi frequentemente referido na literatura nos últimos anos.

A radiação micro-ondas tem sido usada para acelerar as reações, especialmente em reações enzimáticas em meio não-aquoso desde a última década. A maioria dos estudos enfocou o efeito de micro-ondas na taxa de reação inicial conversão de reagente e/ou seletividade de reação, enquanto poucos relatos relacionados como o efeito não térmico têm influência na afinidade do substrato ou no mecanismo enzimático. O aquecimento de líquidos, usando micro-ondas, pode ser explicado pela interação da matéria com o campo eletromagnético da radiação incidente, causando o movimento de íons, bem como de dipolos induzidos ou permanentes. Além do rápido aquecimento dos materiais, alguns autores consideram que as micro-ondas podem fornecer efeitos específicos (não puramente térmicos) geralmente ligados à absorção seletiva de energia de micro-ondas por moléculas polares (PERREUX, L.; LOUPY, A.; 2006). De acordo com esse conceito, a radiação micro-ondas resulta em uma mudança nas propriedades termodinâmicas dos sistemas reativos. Um exemplo deste efeito seria a redução da energia livre de Gibbs de ativação de reações devido ao armazenamento de energia de micro-ondas como vibração de energia de uma molécula ou de um grupo funcional (efeito de entalpia), ou pelo alinhamento das moléculas (efeito entrópico) (LOUPY, A., PERREUX, L., LIAGRE, M., *et al.*, 2009). Além disso, acredita-se que as micro-ondas favorecem a eficiência das colisões moleculares, devido à orientação das moléculas polares envolvidas na reação. Todas essas propriedades tornam a radiação micro-ondas uma ferramenta interessante para o processo enzimático.

A evolução no desenvolvimento da técnica de aplicação das micro-ondas no processamento de catálise enzimática é notável. Com o propósito de se obter maior confiabilidade no controle dos parâmetros experimentais, substituíram-se os fornos domésticos por equipamento específico. Assim, pode-se verificar a real influência daqueles parâmetros na eficiência do processo. Todos os trabalhos até então publicados foram conduzidos em batelada, e considerando apenas um modo de aplicação da radiação, monomodo ou multimodo. Contudo, ainda não se buscou analisar a influência da variação do mecanismo de incidência das micro-ondas na eficiência do processo.

Desta feita, o processamento, via aquecimento por radiação micro-ondas, surge como alternativa promissora. Uma vez que se dá de maneira localizada, a amostra é aquecida do seu interior para fora, em contraposição ao aquecimento superficial gerado pelo método convencional. Todavia, a aplicação do aquecimento dielétrico gerado pelas micro-ondas não aparece como técnica substituta àquelas já estabelecidas, mas auxiliar.

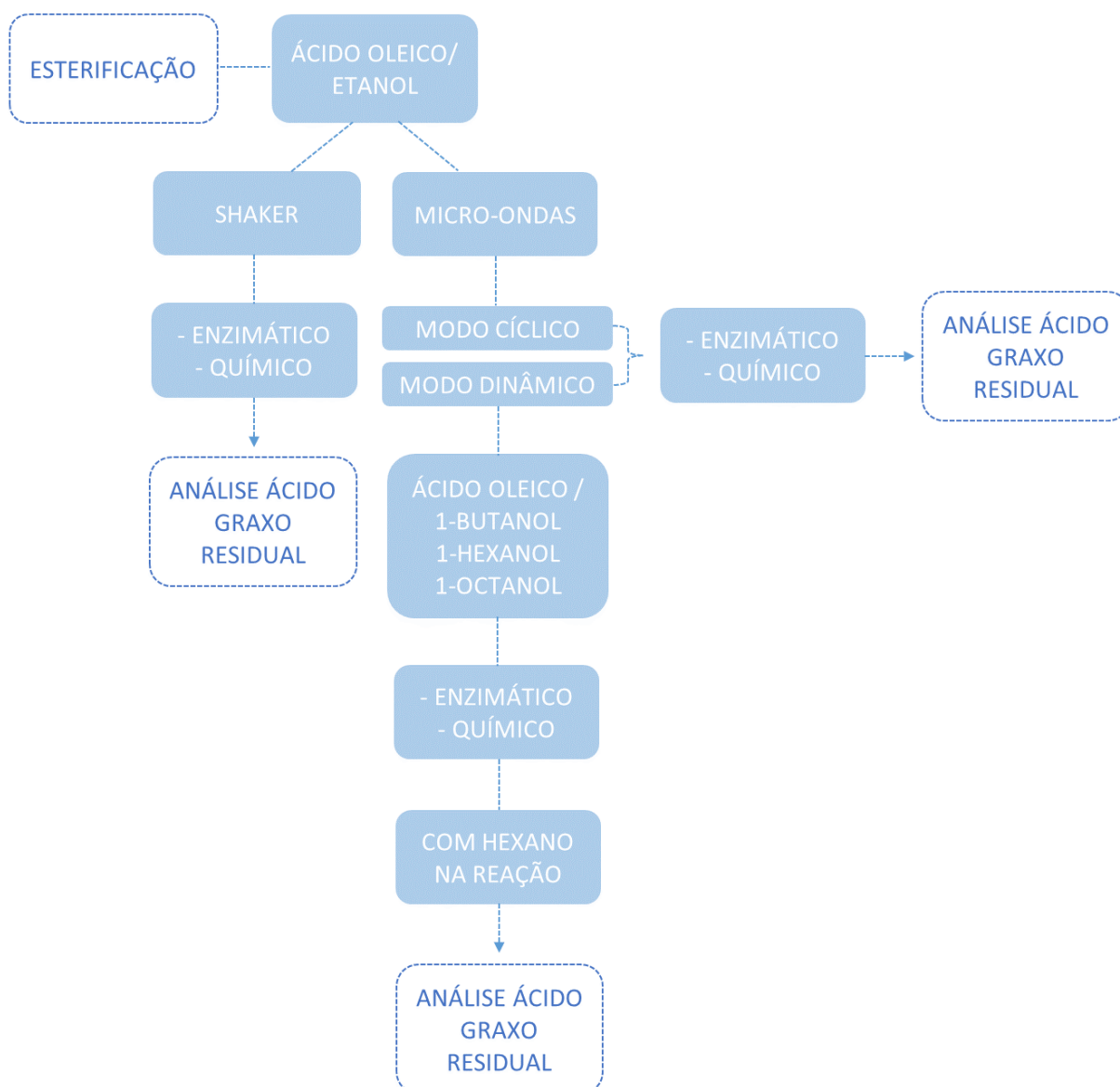
Assim, é de extrema importância para a indústria compreender as melhores maneiras de se aplicar o aquecimento micro.

Diante do cenário atual, este trabalho busca o levantamento de dados técnicos sobre o efeito da aplicação de radiação micro-ondas, monomodo, sobre a eficiência da esterificação enzimática e química.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS**

Neste capítulo será apresentada a descrição das atividades realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho. Os experimentos foram executados no Laboratório de Efluentes da Universidade Federal da Fronteira Sul – Erechim e no Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais – NUESC, o qual pertence ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracajú – SE.

Figura 3 – Fluxograma evidenciando as atividades realizadas para análise da esterificação de ácido oleico em aquecimento convencional e micro-ondas por síntese química e enzimática.



### 3.1 MATERIAIS

Nas reações enzimáticas utilizou-se a lipase utilizada NS-40116 livre em formulação líquida desenvolvida pela empresa *Novozymes®*, produzida a partir do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*. Para as reações utilizando catalisador químico, foi utilizado o Ácido Sulfúrico (98% Synth). Para reações e análises, foram utilizados álcool etílico (Synth), 1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol (Sigma-Aldrich), ácido oleico (Dinâmica), hexano (Synth), acetona (Dinâmica), solução de hidróxido de sódio 0,02N (Vetec), éter (Dinâmica) e água destilada. Os reagentes e os solventes possuem grau PA e foram empregados como recebidos, sem nenhuma purificação adicional.

### 3.2 UNIDADES EXPERIMENTAIS

Os experimentos para esterificação do ácido oleico foram conduzidos em reator batelada, caracterizado como modo convencional, bem como em reator micro-ondas monomodo, com modo de operação cíclico e dinâmico. Tais unidades são apresentadas a seguir.

#### 3.2.1 Reator em batelada convencional

Os ensaios, via reator convencional, foram realizados em reator de batelada, conforme Figura 3. Com temperatura de 45°C, agitação de 250 rpm, no qual foram alojados frascos de vidro que continham a mistura reacional (composta por álcool, ácido oleico e catalisador), devidamente fechados, conforme os tempos de reação estabelecidos. Concluído o tempo de reação, os tubos eram retirados e imediatamente coletadas amostras para realizar as análises descritas posteriormente.

Figura 4 – Reator de batelada convencional utilizado para as reações de esterificação química e enzimática do ácido oleico empregando aquecimento convencional.



### 3.2.2 Reator micro-ondas monomodo

O equipamento micro-ondas monomodo que foi utilizado neste trabalho é o reator micro-ondas da marca CEM, modelo Discover. Este equipamento possui uma única cavidade com sete pontos diferentes de emissão das micro-ondas, potência máxima de 300 W e recipiente de vidro, tipo tubo, com volumes de 10ml e 35ml. Também possui acessórios para a utilização de balões de vidro com fundo redondo com até 100ml, em sistema aberto, utilizando o condensador. A Figura 5 apresenta uma vista geral e detalhada do reator micro-ondas.

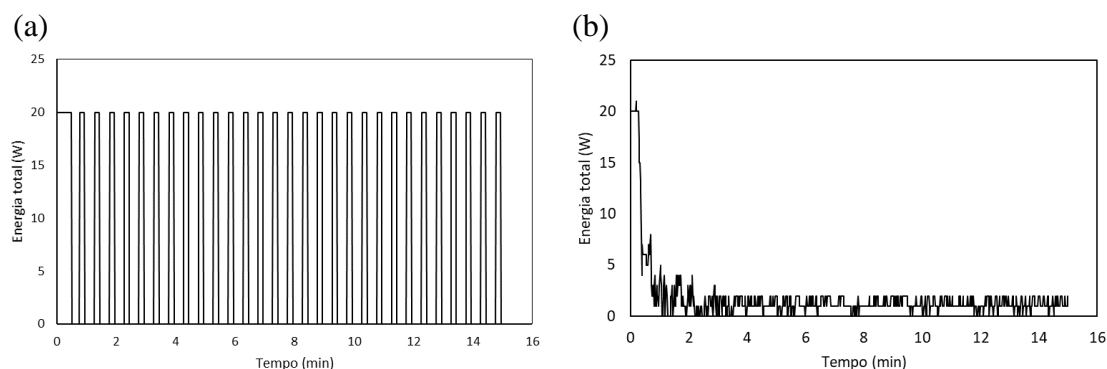
Figura 5 – Vistas do reator micro-ondas monomodo (CEM, modelo Discover) utilizado para as reações de esterificação química e enzimática do ácido oleico empregando radiação micro-ondas.



O reator de micro-ondas tem uma agitação mais eficiente devido ao modelo de frasco e único ponto de agitação, o que favorece a estabilidade da mistura no meio reacional ácido/álcool/catalisador. O software operacional do equipamento faz o controle instantâneo de tempo, de pressão, de temperatura e de potência, parâmetros que podem inclusive ser alterados no decorrer da reação. Adicionalmente, o reator possui modos de trabalhos distintos que variam a forma de emissão das micro-ondas no reator. O modo cíclico, que tem potência pré-definida (20W), mantendo a temperatura (entre 45 °C e 60 °C) e o modo dinâmico onde a potência é modulada (até 20W) em função da temperatura (45 °C). Ambos os modos de irradiação podem ser visualizados na Figura 6.



Figura 6 – Perspectiva da energia das micro-ondas direcionada na amostra, nos modos cíclico (a) e dinâmico(b).



Fonte: Autor.

### 3.3 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

#### 3.3.1 Esterificação de ácido oleico utilizando lipase NS-40116 em modo convencional

Foram realizadas reações de esterificação do ácido oleico e do etanol (razão molar 1:6) em um volume de aproximadamente 5ml, utilizando 0,1g (2%) da lipase NS-40116 livre como catalisador e 0,5g (10%) de água (denominada mistura reacional), valor determinado a partir de levantamentos realizados na literatura e de recomendações do fabricante da enzima. O frasco, contendo a mistura reacional, foi levado ao reator batelada a 45 °C com agitação de 250 rpm. A razão molar ácido/álcool é um parâmetro importante em reação de esterificação uma vez que a reação é reversível. Segundo Chiaradia *et al.* (2012) e Azudin *et al.* (2013), um excesso de álcool pode afetar positivamente o processo de conversão. Alta concentração de álcool geralmente leva aos níveis mais elevados de conversão devido à disponibilidade de excesso de nucleófilo para transferência do substrato. Os parâmetros definidos para o procedimento experimental foram baseados em trabalhos anteriores da literatura, como Fagundes (2016) e Santos (2016), além de considerados os estudos realizados por nosso grupo de pesquisa. As reações foram conduzidas independentemente nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min.

### **3.3.2 Esterificação de ácido oleico utilizando catalisador químico em modo convencional**

Foram realizadas reações de esterificação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:6) em um volume de aproximadamente 5ml, utilizando 0,05g de ácido sulfúrico como catalisador. O procedimento realizado para essa reação foi o mesmo descrito no item 3.3.1.

### **3.3.3 Esterificação de ácido oleico em micro-ondas monomodo**

Os ensaios *via* micro-ondas monomodo em batelada foram realizados em um reator Discover sp (CEM), conforme Figura 5. Com uma potência máxima de aplicação de 300 W, este equipamento emite radiação a uma frequência de 2,45 Ghz. A energia é aplicada de forma direcionada e concentrada na amostra. A cavidade de aplicação das micro-ondas é de tamanho relativamente reduzido, na qual foi alojado apenas um tubo por vez. Cerca de 5ml das amostras a serem irradiadas eram colocadas em tubos de quartzo com 50ml de volume.

O sistema de controle de temperatura é localizado no fundo da cavidade, onde um sensor infravermelho capta a variação de temperatura no fundo do frasco. Há também um controle interno de pressão, contudo o reator não permite a pressurização do tubo antes de iniciar o processamento. Tal pressurização se deu conforme o meio reacional entrava em vaporização. Os limites de temperatura e a potência foram de 40 °C a 60 °C e 20 W, respectivamente, valores estes ajustados no painel de controle do equipamento. Os tempos de aquecimento pré-determinados nas reações foram contabilizados após a temperatura desejada ser atingida.

Concluída a reação, os tubos eram resfriados por correntes de convecção de ar comprimido até atingir a temperatura de 40 °C, permitindo assim o manuseio com segurança. As amostras eram então removidas para a caracterização dos produtos. Também era feita análise visual do volume do meio reacional nos frascos, a fim de certificar-se que não havia evaporação visual dos álcoois durante o processo.

### **3.3.4 Estudo de diferentes álcoois nas reações de esterificação**

Foram realizadas reações de esterificação com diferentes álcoois; 1-butanol, 1-hexanol e 1-octanol, na mesma razão molar de 1:6 (ácido oleico:álcool) para verificar a produção de ésteres de cadeia longa. Definiu-se por dois tempos reacionais de 30min e 90min para estas reações. Devido a cadeia longa destes álcoois, a reação é dificultada, levando a necessidade da utilização do solvente n-hexano para que fosse garantida a solubilidade total do sistema. Os experimentos foram realizados com a adição de 1,7ml de hexano no volume de 3,3ml de meio reacional, mantendo o volume total de 5ml de meio, assim como adicionado 2,5ml de hexano no volume total de 5ml de meio. Essa diferença volumétrica foi realizada, considerando o fato de o aquecimento micro-ondas se dar de forma volumétrica, com isso foi possível identificar se o volume total influenciaria no resultado.

### 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.4.1 Determinação da atividade enzimática (AE)

A atividade enzimática foi quantificada através de uma reação de síntese, empregando o ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) como reagentes (mistura padrão). A reação foi iniciada pela adição da enzima NS-40116 livre (0,1 g da solução enzimática) em 5ml da mistura padrão e conduzida a 40 °C durante 40 minutos, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Para as medidas de acidez, alíquotas de 0,5ml foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra, foram adicionados 15ml de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para interromper a reação. A quantidade de ácido oleico remanescente foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M até o meio atingir pH 11. Os ensaios dos brancos das amostras continham 0,5ml da mistura padrão e 15ml da solução de acetona-etanol.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1µmol de ácido graxo por minuto por grama de catalisador, nas condições do ensaio, calculada pela Equação 1 (FERRAZ et al. 2012).

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c} \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

$V_a$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

$V_b$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

$V_f$  = volume total do meio reacional (mL);

t = tempo (min);

m = massa da enzima livre (g);

$V_c$  = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

### 3.4.2 Determinação de ácidos graxos livres (AGL)

Para a determinação dos ácidos graxos livres, foi utilizado o método de Freire *et al.* (1997) nas amostras da reação enzimática. A cada alíquota de 0,5mL do meio reacional, foram adicionados 50mL de uma solução de éter-etanol (1:1) (v/v) para parar a reação. Na sequência, cada amostra foi titulada com solução de NaOH 0,02N até pH 11. A partir do volume gasto de NaOH na titulação, foi obtida a concentração de ácidos graxos livres de cada amostra, expressos em  $\mu\text{mol/mL}$ , calculados pela Equação 2.

$$AGL = \frac{V_{NaOH} * N * 1000}{V_a} \quad \text{Eq. 2}$$

onde:

$V_{NaOH}$  = volume de NaOH gasto na titulação (mL);

N = normalidade da solução de NaOH;

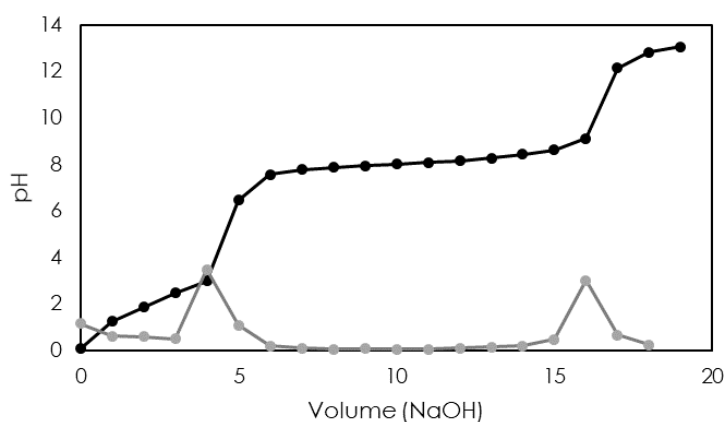
$V_a$  = volume da amostra na reação (mL).

#### 3.4.2.1 Titulação potenciométrica dos ácidos graxos livres nas reações com catalisador químico

Para calcular a conversão do ácido oleico na reação, foi necessária a determinação do seu teor no início e no final da mesma. As amostras coletadas continham dois ácidos: oleico e o sulfúrico. Para quantificar apenas o conteúdo de ácido oleico e, por consequência, a conversão da reação, aplicou-se o conceito de curva de titulação potenciométrica (HARRIS; DANIEL, 2005).

Sabe-se que em uma mistura contendo um ácido forte e um ácido fraco, é possível determinar as concentrações de ambos os compostos quando a constante de dissociação do ácido fraco for menor que  $10^{-4}$  (SKOOG et al., 2006). Neste sentido, com a curva de titulação potenciométrica (pH vs. Volume de NaOH), representada na Figura 7, foi possível identificar dois pontos de inflexão, o primeiro relacionado ao ácido forte e o segundo ao ácido fraco. A variação destes volumes ( $V_2 - V_1$ ) corresponde ao volume gasto para neutralizar o teor de ácido fraco livre. A real detecção dos pontos de equivalência foi obtida ao calcular a primeira derivada numérica da curva de titulação, reproduzindo os seus respectivos pontos máximos.

Figura 3 – Curva de titulação potenciométrica de um ácido forte e um fraco.



Fonte: Autor.

A Equação 3 representa o cálculo do teor de ácido oleico no meio reacional a partir da curva de titulação potenciométrica

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol \cdot L^{-1}) \cdot (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100 \quad \text{Eq. 3}$$

onde,

$V_1$ : volume (mL) gasto de NaOH para neutralizar  $H_2SO_4$

$V_2$ : volume (mL) gasto de NaOH para neutralizar  $C_{18}H_{34}O_2$

Este método foi executado por titulação manual, e a conversão de ácido graxo livre foi conduzida conforme descrito no item 3.3.6.

### 3.4.3 Determinação da energia total utilizada no micro-ondas

A energia total liberada nos experimentos em micro-ondas foi determinada utilizando o somatório da potência desprendida durante o tempo de reação dada pelo software, dividido pelo volume do meio reacional, expressada em W, conforme a Equação 4.

$$W = \frac{Pt}{V} \quad \text{Eq. 4}$$

onde:

W = energia total;

Pt = somatório da potência da reação;

V = volume do meio reacional (mL);

#### **3.4.4 Tratamento estatístico**

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, com nível de significância de 95% de confiança.

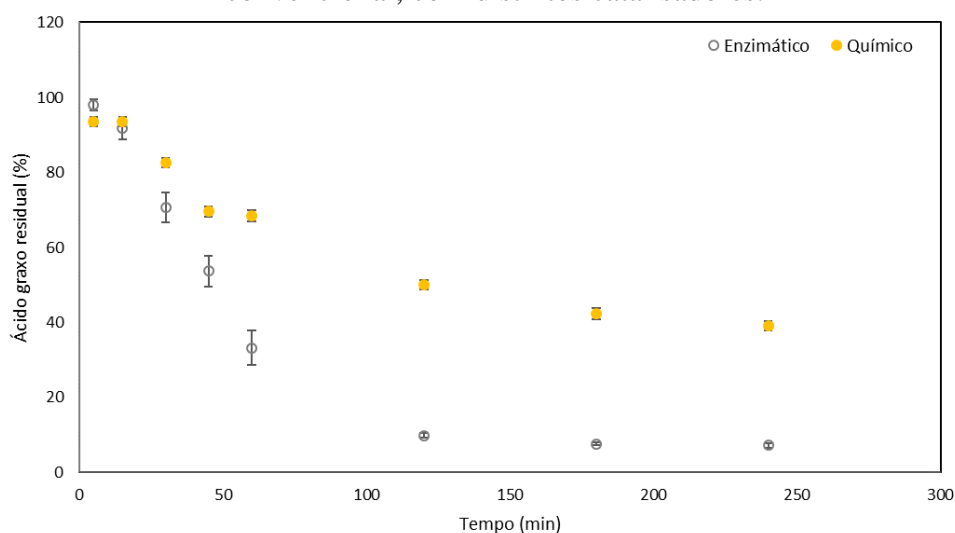
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir da esterificação química e enzimática do ácido oleico, utilizando aquecimento convencional e micro-ondas. O capítulo inicia apresentando a esterificação do ácido oleico com etanol em modo convencional e, na sequência, o efeito da irradiação micro-ondas. Estudos empregando distintos álcoois e modos de aplicação da irradiação micro-ondas são também apresentados na sequência.

### 4.1 ESTERIFICAÇÃO COM CATÁLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA EM MÉTODO CONVENCIONAL

Os resultados obtidos a partir da esterificação de ácido oleico com etanol a 45 °C em aquecimento convencional empregando os catalisadores químicos e enzimáticos são apresentados na Figura 8. Os resultados são reportados como valores médios de duplicatas autênticas realizadas nos experimentos. As barras de erros indicam a incerteza experimental de cada medida, a qual é representada pelo erro da média de cada condição experimental.

Figura 4 – Conversão de ácido oleico residual em função do tempo com aquecimento convencional, com distintos catalisadores.



Observa-se um consumo mais acentuado de ácido graxo nos primeiros tempos reacionais, quando há maior quantidade de substratos disponíveis, o que favorece as

reações de esterificação tanto em meio enzimático, quanto no químico. Após 120 min de reação, o consumo de ácidos graxos pelos dois catalisadores apresenta uma tendência de estabilização. No entanto, o catalisador enzimático atinge níveis de consumo do ácido oleico superiores aos proporcionados pelo uso do catalisador químico, sendo que após cerca de 2 horas de reação, 40% de ácido graxo foi consumido nas reações que utilizaram o catalisador químico e 10% naquelas catalisadas pelo sistema enzimático, sugerindo um melhor desempenho do catalisador enzimático para as condições reacionais investigadas. Este fato se deve ao processo de síntese de ésteres, que é influenciado pela forma das lipases utilizadas (livres ou imobilizadas).

Dentre os parâmetros relevantes nestas reações, está o conteúdo de água. Ela é necessária para realizar algumas etapas da reação, como a hidrólise do ácido graxo da estrutura do triacilglicerol para que, em seguida, o mesmo seja esterificado com o álcool. No processo enzimático, a ausência de água não permite a hidrólise do triacilglicerol, não liberando os ácidos graxos e, portanto, impedindo a ocorrência já da primeira etapa do processo. Além disso, a água é necessária para hidratar a própria enzima, permitindo que o seu sítio ativo encontre o substrato (HAMA; KONDO, 2013; POPPE *et al.*, 2015; SANTOS, 2016), diferente do processo químico, o qual exige ausência ou baixos teores de água. Silva *et al.* (2018a) observou nas reações de transesterificação enzimática da gordura abdominal de frango um aumento gradual de metil ésteres, chegando a 82% em 20h de reação, com a adição de água, enquanto reações sem adição de água obteve 16% como máxima produção de ésteres metílicos após 20h de reação.

Geralmente, as velocidades iniciais das reações químicas são mais rápidas quando comparadas com o catalisador enzimático. Por outro lado, no presente trabalho, as lipases apresentaram resultados mais eficientes sobre o ácido residual, tanto no início da reação quando nas conversões globais alcançadas no final do processo. Este fato pode também estar relacionado à concentração dos catalisadores químicos e enzimáticos empregados, além da própria peculiaridade da lipase utilizada, enzima robusta, produzida para ser utilizada em processos sem pré-tratamentos. Salienta-se que a diferença observada é bastante superior às incertezas experimentais, indicando uma melhora estatisticamente significativa na conversão do ácido oleico dentro das condições experimentais investigadas.

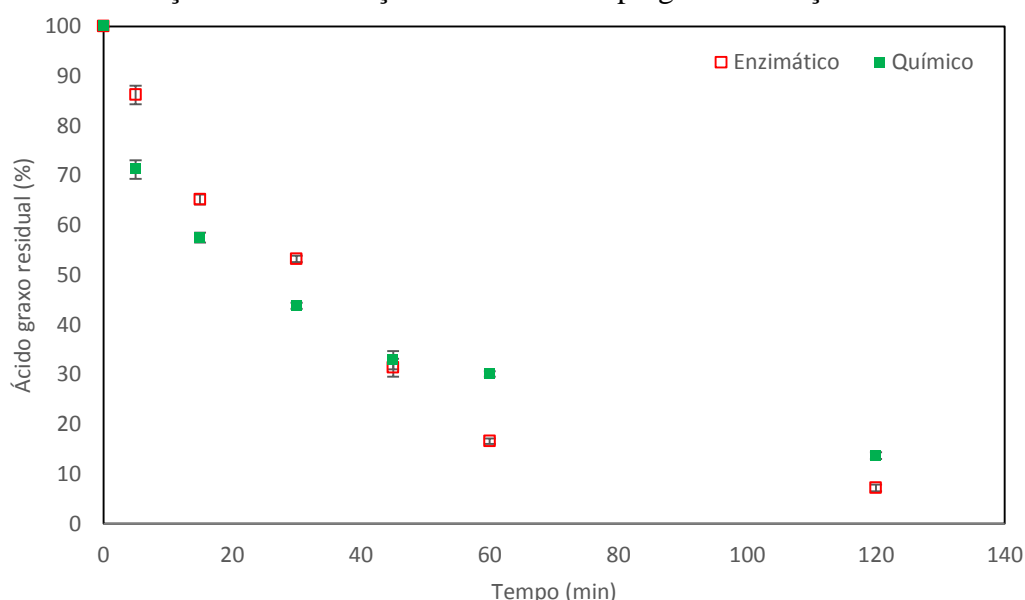


Silva *et al.* (2018a) relataram que concentrações enzimáticas de 0,3 e 0,7% em peso da enzima NS livre 40116, com gordura abdominal de frango, atingiram valores máximos de 92,4 e 82,1%, respectivamente, em conversão de ésteres metílicos.

#### 4.2 ESTUDO DO MICRO-ONDAS SOBRE A CATÁLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA

A Figura 9 apresenta resultados da esterificação de ácido oleico com etanol empregando radiação micro-ondas com catalisadores químico e enzimático.

Figura 5 – Comparação do tipo de catalisador sobre a cinética de consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol empregando radiação micro-ondas.



A partir dos resultados da Figura 9 pode-se inferir inicialmente que ambos catalisadores apresentam potencialidade de uso com radiação micro-ondas, uma vez que foram observadas conversões de 86,3% para o catalisador químico e 92,79% para o enzimático em temperaturas reacionais amenas (45 °C).

Fernandez *et al.* (2014) avaliaram a esterificação de ácidos graxos com etanol em meio homogêneo, catalisada por ácido sulfúrico com irradiação por micro-ondas, e obtiveram conversões de 97% de éster, após 90 min de reação, a uma temperatura de 60 °C, porém com potência de 360 W, muito superior à utilizada neste trabalho que foi de 20 W. Já Zhang *et al.* 2012 estudaram a esterificação de ácidos graxos com metanol catalisada por resina sulfônica, na ausência e na presença de irradiação por micro-ondas,

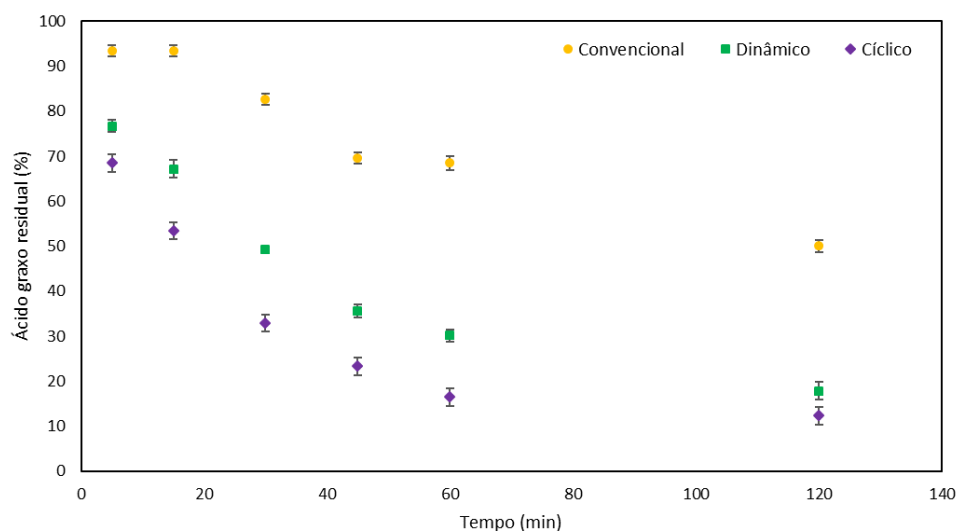
e obtiveram conversões de 90% após 8 horas e 90 min respectivamente. Rade, (2018), no estudo da esterificação contínua de ácido oleico com etanol, razão molar 1:8, com ácido biótico (0,8g), obtiveram conversões de éster de 62%, destacando-se que a temperatura utilizada nas reações foi de 255 °C. Todos os autores citados atingiram esses resultados com faixas de temperaturas mais altas do que as do estudo em questão, o que justifica resultados de conversões maiores dos obtidos nesta investigação.

Observa-se que o substrato enzimático sofre uma interferência das micro-ondas se comparado ao estudo sob aquecimento convencional (Figura 8). Tal fato pode ser explicado pela potência muito alta inserida, em que ocorre uma redução na taxa de reação devido à desnaturação da estrutura da enzima, induzida pelo calor e pela quebra de ligações iônicas de hidrogênio fracas, levando à inativação da enzima (Tabela 6 apêndices).

#### 4.3 ESTUDO DA IRRADIAÇÃO MICRO-ONDAS NOS MODOS CÍCLICO E DINÂMICO

A seguir, serão apresentados resultados obtidos no estudo das micro-ondas, comparando seu modo de operação cíclico e dinâmico com o método convencional. A Figura 10 apresenta os resultados obtidos da esterificação do ácido oleico com etanol empregando o catalisador químico. Na referida Figura estão plotados os dados de ambos os métodos de aplicação da irradiação micro-ondas juntamente com os resultados do aquecimento convencional.

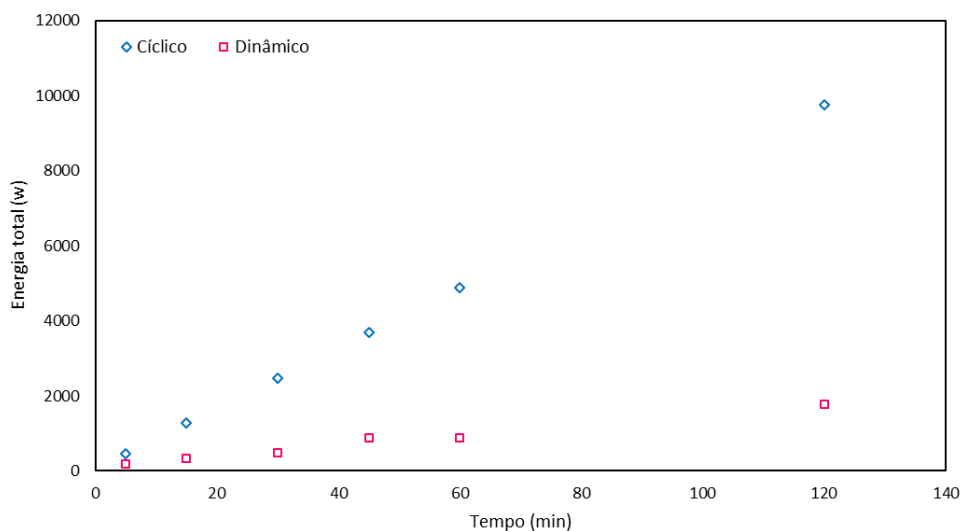
Figura 6 – Comparação dos modos de operação das micro-ondas com método convencional sobre a cinética de consumo de ácido oleico na reação de esterificação com etanol, empregando catalisador químico.



Na Figura 10 pode ser percebido que o emprego da radiação micro-ondas incrementa o consumo de ácido oleico na esterificação química com etanol. Importante salientar que a temperatura de todas as reações é mantida em 45°C.

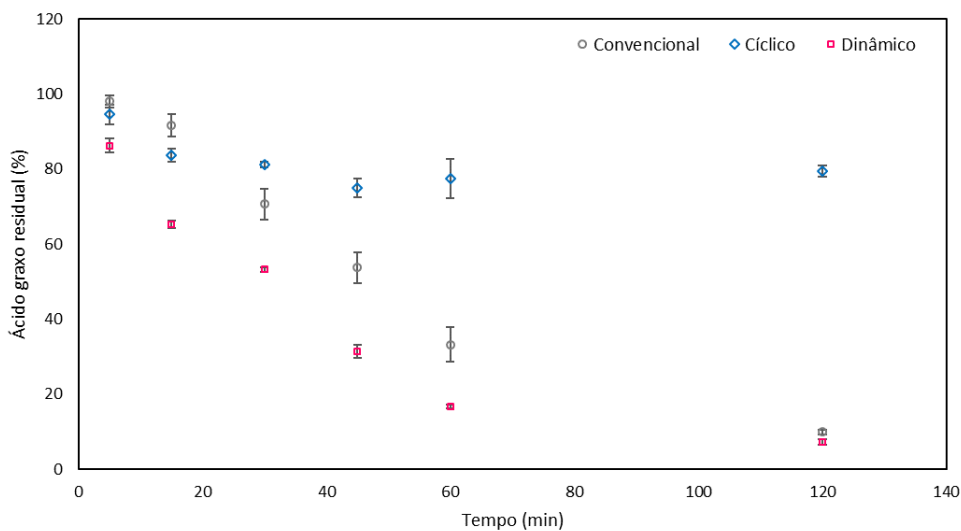
Comparando os métodos de adição da radiação micro-onda, observa-se que o modo cíclico se apresentou ligeiramente superior ao modo dinâmico. O modo cíclico de aplicação das micro-ondas adiciona, na amostra, uma quantidade constante de energia (potência fixa) em tempos pré-determinados (Figura 5). A temperatura média de 45 °C é mantida constante com auxílio do sistema de resfriamento do reator. Porém existe uma oscilação de temperatura de cerca de 5 °C em torno da média neste modo de aplicação. Por outro lado, no método dinâmico a potência irradiada é modulada pelo equipamento visando manter constante a temperatura. Neste modo, a temperatura se mantém constante em 45 °C com oscilações menores do que 1 °C. A consequência destes dois métodos de aplicação da radiação é que a quantidade total de energia irradiada no modo cíclico é superior àquela dispendida no modo dinâmico, conforme apresentada na Figura 11 a seguir.

Figura 7 – Energia total aplicada nas amostras pelos métodos dinâmicos e cíclicos do equipamento CEM discover na catálise química.



A Figura 12 a seguir apresenta os resultados da esterificação de ácido oleico com etanol, empregando catálise enzimática. Os dados são apresentados a partir do aquecimento em modo convencional e sob irradiação micro-ondas nos modos cíclico e dinâmico.

Figura 8 – Ácido graxo residual em função do tempo nos métodos, convencional, micro-ondas cíclico e micro-ondas dinâmico, com catálise enzimática.



Na Figura 12, observaram-se os maiores consumos de ácido graxo (aproximadamente 90%) quando se utilizou, para reação, o método convencional e dinâmico. Não houve diferenças qualitativas quando se analisaram os dois métodos (convencional e micro-ondas dinâmico) no consumo de ácido graxo via catálise enzimática em que, após 60 minutos de reação o consumo foi de aproximadamente 90%.

Ao analisar o perfil cinético obtido quando as micro-ondas eram aplicadas no método cíclico, diferentemente do estudo com catálise química (Figura 10), pode ser percebido que o substrato enzimático sofre uma interferência no método cíclico. Tal fato pode ser explicado pela quantidade excessiva de energia que é aplicada no método cíclico (Figura 11) o que pode levar à inativação da enzima.

Alguns trabalhos da literatura reportam já que quantidades excessivas de energia aplicadas sobre complexos enzimáticos podem levar à inativação das mesmas (QUEIROZ, *et al.*, 2015). Esta observação pode estar relacionada à geração de pontos quentes que, apesar da temperatura *bulk* estar amena (45 °C no caso dos experimentos), localmente a temperatura pode estar mais elevada o que tende a modificar os complexos proteicos das enzimas, levando à sua inativação. Lopes *et al.*, (2015), no estudo da estabilidade e das alterações estruturais da peroxidase de rabanete em micro-ondas em aquecimento convencional, indica que, a 45 °C, a ativação da enzima ocorre como resultado de mudanças conformacionais em sua estrutura terciária, enquanto a região do sítio ativo é mais protegida, porém acessível ao substrato por meio de mudanças em sua estrutura secundária, que se torna menos comprimida.

Em contraste, a 60 °C, estruturas secundárias e terciárias foram abruptamente alteradas pela ruptura de interações importantes que mantêm a proteína ativa. Assim, o reconhecimento do substrato pelo sítio ativo da enzima não é mais possível. Outro aspecto que deve ser levando em consideração no método dinâmico é a oscilação da temperatura ao longo do experimento, que apresenta valores médios em torno de 45 °C. Porém oscilações elevadas de até 5°C são observadas, o que pode influenciar na atividade do complexo enzimático.

#### 4.4 ESTUDOS DE DIFERENTES ÁLCOOIS NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

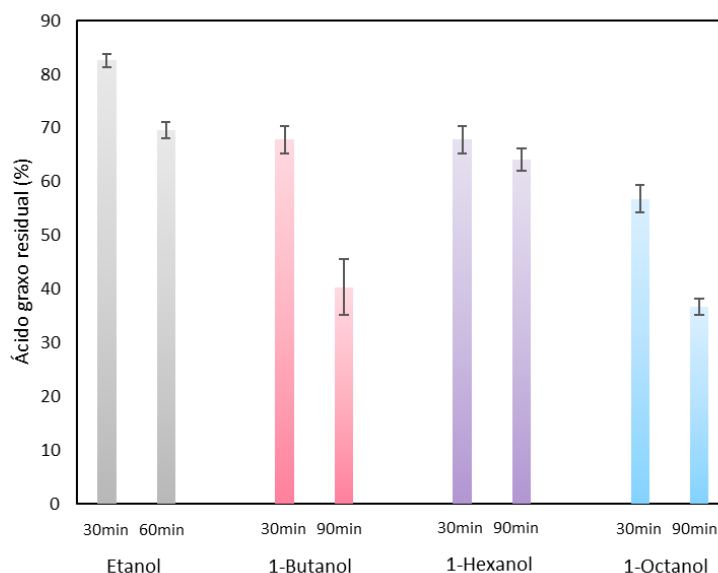
Tendo em vista os resultados obtidos em micro-ondas dinâmico utilizando catalisador enzimático, propôs-se um estudo da variação dos tipos de álcoois nas reações de esterificação com ácido oleico. A investigação de distintos álcoois na esterificação leva a produção de ésteres de cadeia longa com distintas aplicações (SANTOS, 2015). Como forma de organizar os resultados, os ensaios foram divididos em duas seções: uma abordando a catálise química do ácido oleico empregando uma série homóloga de álcoois (etanol, n-butanol, n-hexanol e n-octanol) sob aquecimento

convencional e micro-ondas e uma segunda seção abordando a catálise enzimática destes sistemas.

#### 4.4.1 Catálise química

A Figura 13 mostra os resultados obtidos da esterificação do ácido oleico com etanol, 1-butanol, 1-hexanol e 1-octanol a 45 °C, durante 30 min e 90 min (definidos tempos intermediários aos experimentos realizados) de reação empregando o catalisador químico sob aquecimento convencional. Para o etanol, utilizou-se os resultados obtidos previamente no estudo.

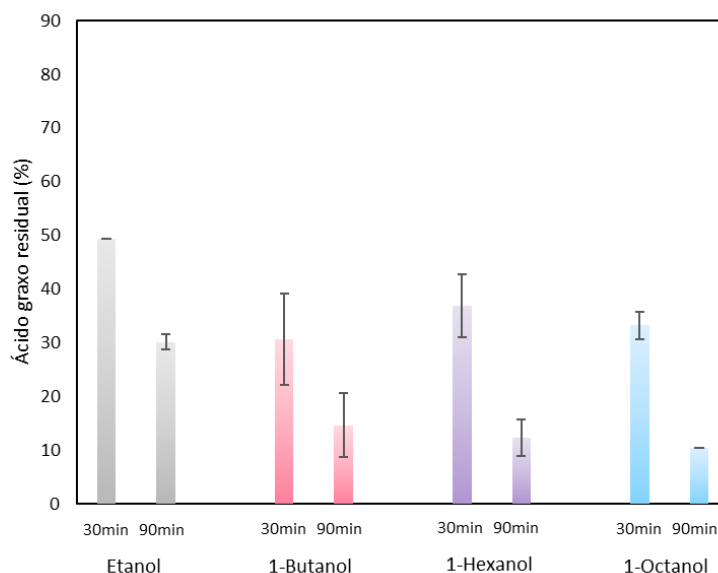
Figura 9 – Esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, empregando catalisador químico, sob aquecimento convencional.



Observa-se na Figura 13 um consumo aproximado entre 20 e 30% do ácido oleico para os distintos álcoois durante os 30 minutos iniciais da reação. A conversão do ácido é continuada, de forma que o ácido graxo residual é diminuído para todos os álcoois em tempos da ordem de 90 minutos. Para o etanol, não foram medidos valores em 90 minutos reacionais, porém a análise da Figura 8 (onde foi conduzida uma cinética da reação com etanol) sugere valores da ordem de 50% de ácido graxo residual. A partir da Figura 13, observa-se também que o maior consumo de ácido graxo após 90 min de reação ocorreu para 1-octanol (cerca de 65% do valor inicial).

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos da esterificação do ácido oleico com etanol, 1-butanol, 1-hexanol e 1-octanol durante 30 min e 90 min de reação empregando o catalisador químico, sob aquecimento micro-ondas. Qualitativamente, pode ser observado que os mesmos efeitos observados no aquecimento convencional estiveram presentes, nos quais todos os álcoois se mostraram reativos no início do processo (30 minutos de reação) e, na sequência, a reação teve sequência consumindo o ácido graxo e diminuindo o valor residual deste composto no final da reação. A Figura 14 evidencia também que os álcoois de maior cadeia propiciam um maior consumo do ácido oleico após 90 minutos de reação, onde para os álcoois superiores (C4, C6 e C8) apresentaram valores de ácido residual em torno do 10% do original.

Figura 10 – Efeito das micro-ondas na esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, durante o período de 30min e 90 min empregando catalisador químico, sob aquecimento micro-ondas.

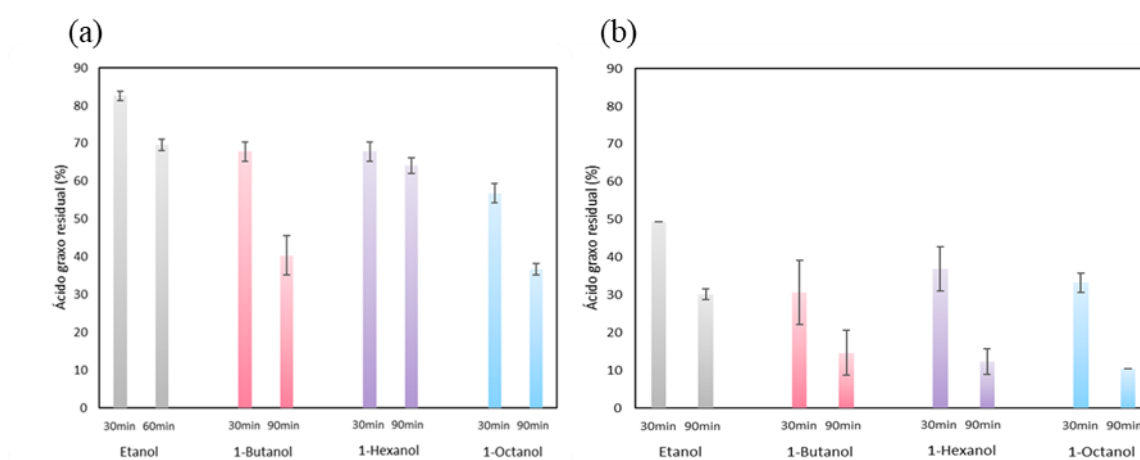


Zhang et al. (2012) estudaram a esterificação do óleo de fritura, com alto índice de acidez (152,3 mg KOH/g), com o metanol, o etanol e o butanol catalisados por resina sulfônica. Melhores resultados foram encontrados com butanol, enquanto a conversão com etanol foi menor do que a obtida com metanol. Os autores atribuíram esse resultado à possibilidade de ter ocorrido, provavelmente, maior inchamento da resina com metanol, o que facilitou a reação de esterificação. Nos experimentos deste trabalho em que empregaram catálise homogênea, tal fato pode ser atribuído a uma maior proporção

volumétrica dos álcoois de cadeia longa (a razão molar era fixa em 1:6), o que pode auxiliar o contato do ácido graxo com as moléculas de álcool.

A Figura 15 apresenta uma comparação entre os modos de aquecimento sobre o teor de ácido oleico residual na esterificação com distintos álcoois. Para efeitos de apresentação a comparação está dividida em distintos tempos reacionais: 30 e 90 min.

Figura 11 – Estudo comparativo dos métodos convencional (a) e micro-ondas (b) em 30min e 90min, empregando catalisador químico.



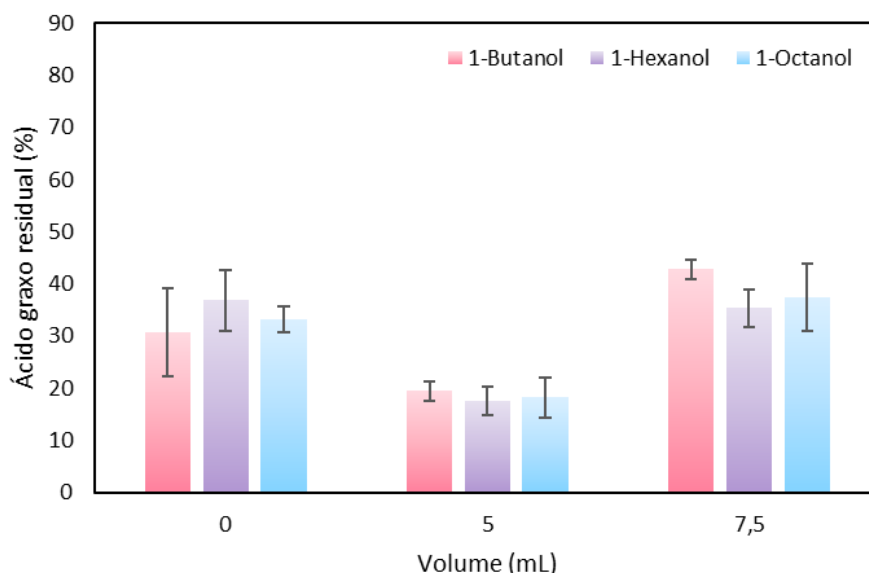
A Figura 15 mostra claramente que a radiação micro-ondas acelera a reação de esterificação do ácido oleico. De fato, para todas as condições e todos os tempos reacionais, a Figura 15 sugere que, independente do álcool utilizado, a catálise ácida com ácido sulfúrico é incrementada quando se usa micro-ondas no lugar do aquecimento convencional. Este fato pode ser atribuído a possíveis pontos quentes produzidos em torno do micro domínio do catalisar ácido, o que pode auxiliar a cinética da reação.

Uma vez que os ésteres produzidos com os álcoois de maior cadeia tendem a ser mais hidrofóbicos, foi conduzido um estudo avaliando a adição de n-hexano (solvente apolar e transparente às micro-ondas) sobre a reação de esterificação do ácido oleico no tempo de 30min. Nestes testes, foi avaliada a adição de 1,7ml de hexano no volume de 3,3ml de meio reacional, mantendo o volume total de 5ml de meio. Estes testes estão denominados “5 ml”. Em outra bateira de testes, foram adicionados 2,5ml de hexano no volume total de 5ml de meio reacional (estes testes foram denominados “7,5 ml”). Em



outras baterias, “0 ml”, o hexano foi adicionado após transcorrido o tempo da reação de esterificação, somente solubilização da amostra antes da análise. A figura 16 apresenta os resultados destes ensaios.

Figura 12 – Esterificação de ácido oleico com distintos álcoois na presença de hexano em 30 minutos de reação empregando catalisador químico em aquecimento micro-ondas.



A Figura 16 sugere inicialmente que a adição de n-hexano ao meio reacional pode ser positiva para os volumes de 0 e 5 ml (sem e com adição de hexano). Este resultado corrobora com os estudos reportados por outras esterificações que aplicaram diretamente o  $H_2SO_4$  como catalisador na presença de n-hexano (LUCENA *et al.*, 2011; HANH *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Apesar deste efeito ter sido relativamente fraco, (porém é um efeito estatisticamente significativo com  $p < 0,05$  no teste de Tukey), esta observação pode estar relacionada ao hexano ter deixado o meio reacional mais homogêneo.

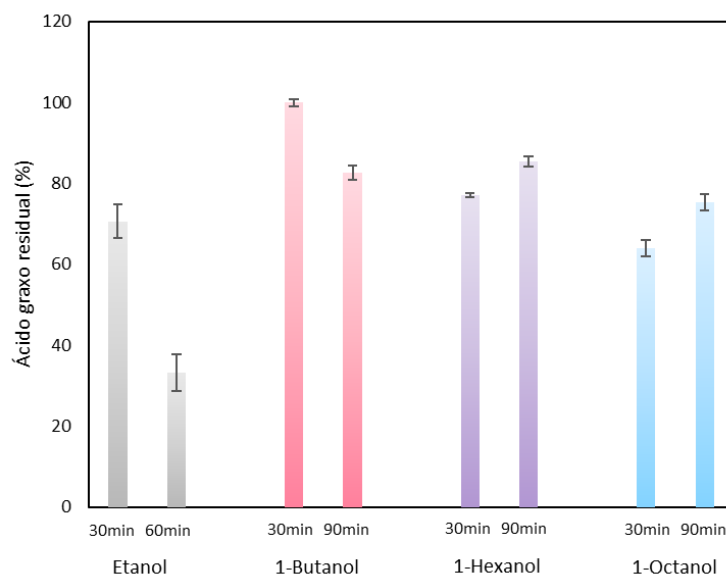
Quando se tem volumes reacionais muito grandes, a radiação pode chegar em intensidades menos pronunciadas em regiões profundas da amostra, diminuindo a eficiência global do processo. Este fato pode ter ocorrido quando se conduziram as reações em um maior volume total (7,5 ml). Outro fator que pode ser considerado na Figura 16 é que para as reações que continham 5 ml de meio reacional (0ml e 7,5 ml), o consumo de ácido graxo foi inferior do que aquela que tinha menos meio reacional (3,3ml de meio reacional na reação denominada “5ml”). Considerando que o meio

absorvedor de micro-ondas é o meio reacional (molécula polares ao passo que o n-hexano é transparente as micro-ondas), a quantidade de radiação para o meio reacional “5mL” é maior, sugerindo um maior consumo de ácido.

#### 4.4.2 Catálise enzimática

Os resultados apresentados na Figura 17, referem-se às reações de esterificação de ácido oleico em aquecimento convencional com etanol, com 1-butanol, com 1-hexanol e com 1-octanol a 45 °C durante 30min e 90min de reação, empregando o catalisador enzimático.

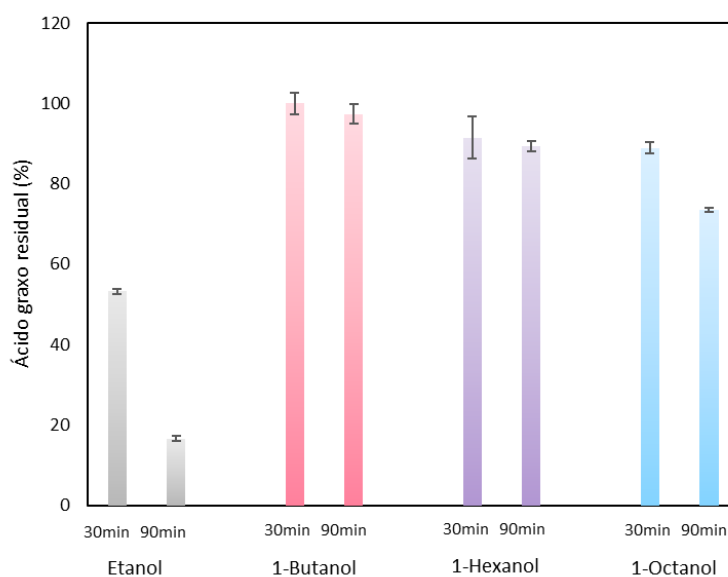
Figura 13 – Esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, empregando catalisador enzimático, sob aquecimento convencional, em diferentes tempos reacionais.



Observa-se na Figura 17 que também para a catálise enzimática em meio convencional é possível ocorrer a reação de esterificação de ácido oleico com distintos álcoois. Porém, o tamanho da cadeia do álcool parece agora apresentar efeito no processo, em que, para os álcoois de maior cadeia (C6 e C8), o consumo do ácido graxo não é incrementado com o tempo entre 30 e 90 minutos de reação.

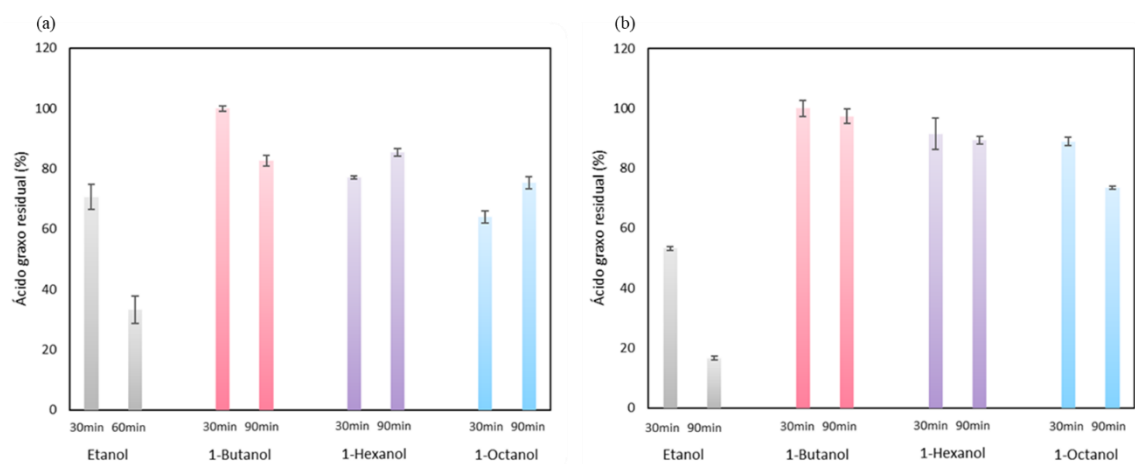
A Figura 18 apresenta os resultados obtidos da esterificação do ácido oleico com etanol, com 1-butanol, com 1-hexanol e com 1-octanol a 45 °C, durante 30 min e 90 min de reação empregando o catalisador enzimático, sob aquecimento micro-ondas. Pode ser observado nesta figura que o efeito do tamanho da cadeia do álcool é bastante pronunciado na catálise enzimática em micro-ondas, sendo que, onde para os álcoois de cadeia longa a conversão foi próxima de zero.

Figura 14 – Efeito das micro-ondas na esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, em diferentes tempos reacionais, empregando catalisador enzimático.



A Figura 19 apresenta uma comparação das reações de esterificação enzimática de ácido oleico com aquecimento micro-ondas e convencional em distintos tempos reacionais.

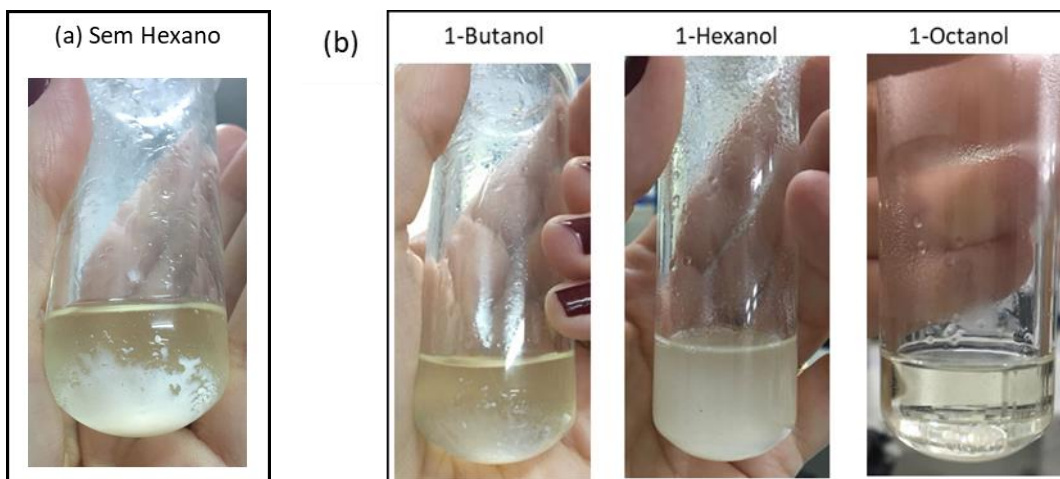
Figura 15 – Estudo comparativo dos métodos convencional (a) e micro-ondas (b) em 30min e 90min, empregando catalisador enzimático.



Observando na Figura 19, que para os álcoois estudados, o etanol tem destaque em diferentes tempos e aquecimentos, quando comparado com os demais álcoois, cerca de 70% e 30% em 30min para o aquecimento convencional e 55% e 18% em 90min para o aquecimento micro-ondas, respectivamente. Ao compararmos os demais álcoois (1-Butanol, 1-Hexanol, 1-Octanol), os resultados indicam que a conversão da reação é enormemente afetada pelo tamanho da cadeia.

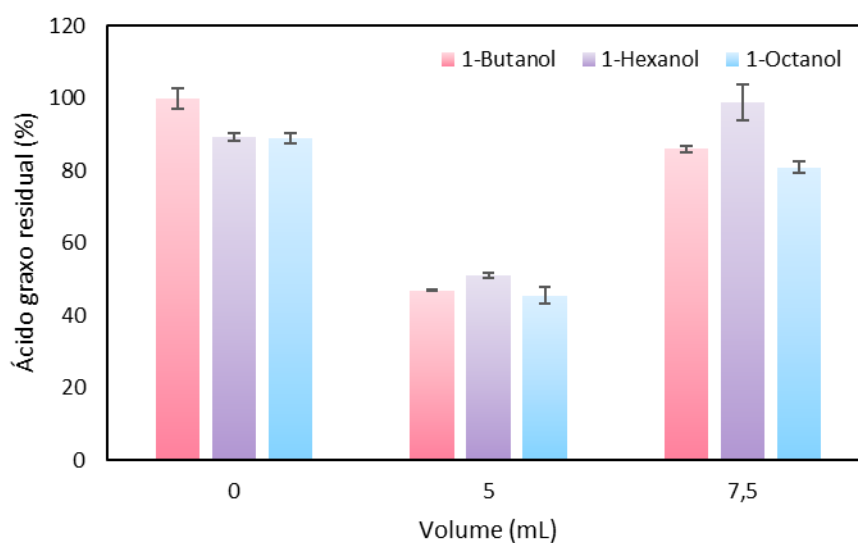
Buscando avaliar se este efeito era relacionado à miscibilidade do meio reacional, avaliou-se o efeito da adição de n-hexano ao meio. A Figura 20 mostra vistas dos frascos reacionais sem a presença de hexano na reação (a) e com adição de hexano no meio reacional (b).

Figura 16 – Solubilidade do meio reacional submetido ao efeito das micro-ondas sem adição de hexano (1-butanol) (a), com distintos álcoois na presença de hexano (b).



O estudo foi conduzido seguindo o mesmo procedimento da seção anterior: 0mL: o n-hexano foi adicionado após a reação, onde 5 ml do meio reacional sem n-hexano foi levado à reação em micro-ondas e o solvente então adicionado ao final da reação para solubilização do meio; “5 ml”: 1,7 ml de n-hexano foi adicionado a 3,3 ml do meio reacional e “7,5 ml”: 2,5 ml de n-hexano foram adicionados a 5 ml do meio reacional. A Figura 21 apresenta resultados que demonstram uma melhor mistura da amostra quando se adiciona n-hexano ao meio reacional. Porém, maiores volumes reacionais parecem também prejudicar a conversão da reação.

Figura 17 – Efeito das micro-ondas na esterificação de ácido oleico com distintos álcoois, na presença de hexano no meio reacional, empregando catalisador enzimático.





## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões relativas à esterificação frente à catálise química e enzimática, para os dois métodos de aquecimento, convencional e micro-ondas, estão apresentadas por cada objetivo específico definido no início do trabalho.

A energia das micro-ondas apresentou grande potencial no aumento da taxa de reação, tanto na esterificação por catálise química quanto na enzimática, mostrando vantagem se comparado ao sistema convencional. Destaque maior ao sistema dinâmico, onde, para ambos os catalisadores, percebeu-se menor quantidade de ácido residual, considerando que, para o catalisador enzimático, o modo de operação cíclico, comprometeu o desempenho da lipase.

*i. Avaliar a cinética da esterificação de ácido oleico em meio homogêneo com etanol empregando lipase NS-40116 livre e ácido sulfúrico.*

Os dados do estudo da esterificação de ácido oleico em meio homogêneo com etanol, empregando catalisador enzimático e químico, confirmam um consumo mais acentuado de ácido graxo nos primeiros tempos reacionais, quando há maior quantidade de substratos disponíveis, o que favorece as reações de esterificação tanto em meio enzimático, quanto no químico. Após 60 min de reação, o consumo de ácidos graxos pelos dois catalisadores apresenta uma tendência de estabilização.

*ii. Avaliar efeito da irradiação micro-ondas, modo cíclico e dinâmico, sobre a esterificação enzimática de ácido oleico e catalisador químico.*

Para o estudo do efeito da irradiação micro-ondas nos modos cíclico e dinâmico com catálise química, foi possível observar que o modo cíclico se apresentou superior ao modo dinâmico. Diferentemente deste estudo, ao analisar o perfil cinético obtido quando as micro-ondas eram aplicadas no método cíclico, pode-se perceber que o substrato enzimático sofre uma interferência no método cíclico. Tal fato pode ser explicado pela quantidade excessiva de energia que é aplicada no método cíclico o que pode levar a inativação da enzima. Os resultados indicaram que o uso de micro-ondas melhorou a atividade no modo de potência fixa para a esterificação enzimática.

*iii. Analisar a esterificação de ácido oleico e diferentes álcoois, empregando a lipase NS-40116 e ácido sulfúrico.*

A partir das conversões obtidas com os diferentes catalisadores e com diferentes álcoois, é possível afirmar que os melhores resultados estão para o catalisador químico. O tamanho da cadeia do álcool exerce uma grande influência sobre a esterificação do ácido oleico via catálise enzimática, ao passo que este efeito é minimizado na catálise química.

- iv. *Avaliar a esterificação de ácido oleico com diferentes álcoois, empregando aquecimento convencional e irradiação micro-ondas.*

Para todos os álcoois em estudo, comparando o modo de aquecimento convencional com a irradiação micro-ondas, foi possível observar que os melhores resultados estão para o aquecimento micro-ondas, no tempo de 90min. De forma geral, os resultados permitem concluir que as micro-ondas exercem um efeito acelerador na reação e que as diferenças entre os aquecimentos são mais pronunciadas em tempos curtos. Em tempos reacionais mais longos, onde se observam os maiores consumos do ácido graxo, o efeito das micro-ondas é “diluído” pelo efeito térmico do processo.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Houria; COMEAU, Louis. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.
- ABCHA, Imen; SOULEM, Safa; NEVES, Marcos A.; WANG, Zheng; NEFATTI, Mohamed; ISODA, Hiroko; NAKAJIMA, Mitsutoshi. Ethyl oleate food-grade O / W emulsions loaded with apigenin: Insights to their formulation characteristics and physico-chemical stability. **Food Research International**, v. 116, p. 953–962, 2019.
- ARFAN, Atef; BAZUREAU, Jean Pierre. Efficient Combination of Recyclable Task Specific Ionic Liquid and Microwave Dielectric Heating for the Synthesis of Lipophilic Esters. **Organic Process Research & Development**, v. 9, p. 743–748, 2005.
- AZCAN, Nezihe; DANISMAN, Aysegul. Alkali Catalyzed Transesterification of Cottonseed Oil by Microwave Irradiation. **Fuel**, v. 86, p. 2639-2644, 2007.
- BERNARDES; Otávio L.; BEVILAQUA, Juliana V.; LEAL, Márcia C. M. R.; FREIRE, Denise M. G.; LAGNONE, Marta A. P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 32, p. 136-140, 2007.
- BHARDWAJ, Anil; HARTLAND, Stanley. Dynamics of Emulsification and Demulsification of Water in Crude Oil Emulsions. **Industrial Engineering Chemical Research**, 33, p. 1271-1279, 1994.
- BILECKA, Idalia; NIEDERBERGER, Markus. Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis. **Nanoscale**, v. 2, n. 8, p. 1358-1374, 2010.
- BLOOMER, Scott; ADLERCREUTZ, Patrick; MATTIASSON, Bo. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 7, p. 546-552, 1992.
- BROCKMAB, Howard L.; MOMSEN, William E.; TSUJITA, Takahiro. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, p. 891-896, 1998.
- CAI, H. C.; GAO, H.; FANG, Y. J.; XIA, Y. M.; FANG, Y. Esterification between amyl alcohol isomers and n-caprylic acid under microwave irradiation-enzyme coupling catalysis (MIECC). **Acta Chimica Sinica**, v. 62, p. 923–928, 2004.
- CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, Srinivasan; BASAK, Tanmay. Microwave Material Processing - A Review. **Journal. American Institute of Chemical Engineers**, v. 58, n. 2, p. 330-363, 2011.
- CHOEDKIATSAKUL, I.; NGAOSUWAN, K.; ASSABUMRUNGRAT, S.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G. Biodiesel production in a novel continuous flow microwave reactor. **Renewable Energy**, v. 83, p. 25–29, 2015.
- CHOUHAN, A. P. Singh; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4378–4399, 2011.

DA RÓS, P. C. M.; FREITAS, L.; PÉREZ, V. H. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 36, n. 4, p. 443-451, 2013.

DA RÓS, P.C.; FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 36, p. 443-451, 2013.

DING, Hui; YE, Wei; WANG, Yongqiang; WANG, Xianqin; LI, Lujun; LIU, Dan; GUI, Jianzhou; SONG, Chunfeng; JI, Na. Process intensification of transesterification for biodiesel production from palm oil : Microwave irradiation on transesterification reaction catalyzed by acidic imidazolium ionic liquids. **Energy**, v. 144, p. 957-967, 2018.

FAN, Yongxian; QIAN, Junqing. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 1-7, 2010.

FENG, Yaohui; ZHANG, Aiqing; LI, Jianxin; HE, Benqiao. A continuous process for biodiesel production in a fixed bed reactor packed with cation-exchange resin as heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3607-3609, 2011.

FENG, Yaoyao; QIU, Ting; YANG, Jinbei; LI, Ling; WANG, Xiaoda; WANG, Hongxing. Transesterification of palm oil to biodiesel using Brønsted acidic ionic liquid as high-efficient and eco-friendly catalyst. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 1222-1229, 2017.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, P. S.; BORGES, L. E. P.; CARVALHO, C. E. G.; SOUZA, R. O. M. A.; Microwave Assisted Biodiesel Production from Trap Grease. **J. Braz. Chem. Soc.** **2014**, 25, 1730.

FERRAZ, Lenir Rigoli; OLIVEIRA, Daniela dos Santos; SILVA, Marcell Fernandes; RIGO, Elisandra; DI LUCCIO, Marco; OLIVEIRA, J. Vladimir; OLIVEIRA, Débora de; TREICHEL, Helen. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.

FISCHER, Emil; SPEIER, Arthur. Darstellung der Ester. Ber. Dtsch. **Chem. Ges.**, v.28, p. 3252-3258, 1895.

FORESTI, M.; FERREIRA, M. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107, p. 23-30, 2005.

FORTUNY, Montserrat; RAMOS, André Luis Dantas; DARIVA, Cláudio; EGUES, Sílvia Maria da Silva; SANTOS, Alexandre Ferreira. Principais aplicações das

microondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1553-1561, 2008.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipases por *Penicillium restrictum***. Tese (Doutorado em Bioquímica), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. **Applied Biochemistry Biotechnology**, vol. 63-65, p. 409-421, 1997.

GANDHI, Neena N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GHIACI, M.; AGHABARARI, B.; GIL, A. Production of biodiesel by esterification of natural fatty acids over modified organoclay catalysts. **Fuel**, v. 90, p. 3382-3389, 2011.

HANH, Hoang Duc; DONG, Nguyen The; OKITSU, Kenji; NISHIMURA, Rokuro; MAEDA, Yasuaki. Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition. **Renewable Energy**, v. 34, n. 3, p. 780-783, 2009.

HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HERNÁNDEZ-MONTELONGO, Rosaura; GARCÍA-SANDOVAL, Juan Paulo; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, Alejandro; DOCHAIN, Denis; AGUILAR-GARNICA, Efrén. Biodiesel production in a continuous packed bed reactor with recycle: A modeling approach for an esterification system. **Renewable Energy**, v. 116, p. 857-865, 2018.

HERNANDO, J.; LETON, P.; MATIA, M. P.; NOVELLA, J. L.; ALVAREZ-BUILLA, J. Biodiesel and FAME synthesis assisted by microwaves: Homogeneous batch and flow processes. **Fuel**, v. 86, p. 1641-1644, 2007.

HORCHANI, Habib; AISSA, Imen; OUERTANI, Selmene; ZARAI, Zied; GARGOURI, Youssef; SAYARI, Adel. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 125-132, 2012.

GOG, Adriana; ROMAN, Marius; TOSA, Monica; PAIZS, Csaba; IRIMIE, Dam, Florin. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renawable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012.

HORIKOSHI, S.; SCHIFFMANN, R. F.; FUKUSHIMA, J.; SERPONE, N. Microwave-assisted chemistry. In: **Microwave Chemical and Materials Processing**. Springer, Cingapura, 2018.

HOUDE, Alain; KADEMI, Ali; LEBLANC, Danielle. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.

HU, X.; ZHOU, Z.; SUN, D.; WANG, Y. Esterification of Fatty Acid by Zirconic Catalysts. Zhang, Z.; **Catal. Lett.**, 133, 90, 2009.

KANDA, Luis Ricardo Shigueyuki; CORAZZA, Marcos Lucio; ZATTA, Leandro; WYPYCH, Fernando. Kinetics evaluation of the ethyl esterification of long chain fatty acids using commercial montmorillonite K10 as catalyst. **Fuel**, v. 193, p. 265–274, 2017.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. **Nature Reviews**, v. 5, p. 51-63, 2006.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. **Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

KHAN, Nishat R.; RATHOD, Virendra K. Microwave assisted enzymatic synthesis of speciality esters : A mini - review. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 89–98, 2018.

KUMAR, Rajnish; MODAK, Jayant; MADRAS, Giridhar. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 199-202, 2005.

LAM, Man Kee; LEE, Keat Teong; MOHAMED, Abdul Rahman. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 500–518, 2010.

LEADBEATER, Nicholas E.; STENCEL, Lauren M. Fast, easy preparation of biodiesel using microwave heating. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 2281-2283, 2006.

LEÃO, L. S. **Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o óxido de níbio**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LI, Liang; YI, Nan; WANG, Xiaoda; LIN, Xiaocheng; ZENG, Ting; QIU, Ting. Novel triazolium-based ionic liquids as effective catalysts for transesterification of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, p. 732–738, 2018.

LI, Tang; ZHANG, Wenfa; HAO, Jianhua; SUN, Mi; LIN, Sheng-Xiang. Cold-active extracellular lipase: Expression in Sf9 insect cells , purification, and catalysis. **Biotechnology Reports**, v. 21, 2019.

LIU, Liuchen; WEN, Zhengzhong; CUI, Guomin. Preparation of Ca/ Zr mixed oxide catalysts through a birch-templating route for the synthesis of biodiesel via transesterification. **Fuel**, v. 158, p. 176–182, 2015.

LIU, Jiuxu; NAN, Yue; HUANG, Xinlei; BOND, Jesse Q.; TAVLARIDES, Lawrence L. Continuous esterification of oleic acid to ethyl oleate under sub/supercritical conditions over  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 232, p. 155–163, 2018.

LOUPY, A.; PETIT.; HAMELIN, J. TEXIER-BOULLET, F.; JACQUAULT, P.; MATHÉ, **Microwave Methods in Organic Synthesis**, 1213, 1998.

LOUPY, A., PERREUX, L., LIAGRE, M., *et al.* Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction

mechanisms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73(1), p. 161-166, 2009. Retirado do doi: 10.1351 / pac200173010161, 2009. Acesso em: 12 fev. 2019.

Lu H., Leung H. T., Wang N., Pak W. L., Shieh B. H. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila* photoreceptors. **J. Biol. Chem**, v. 284, p. 11100–11109, 2009.

LUCENA, Izabelly L.; SABOYA, Rosana M. A.; OLIVEIRA, João F. G.; RODRIGUES, Marcelo L.; TORRES, Antônio E. B.; CAVALCANTE, Célio L.; PARENTE, Expedito J. S.; SILVA, Giovanilton; FERNANDES, Fabiano A. N. Oleic acid esterification with ethanol under continuous water removal conditions. **Fuel**, v. 90, n. 2, 902-904, 2011.

MADALOZZO, Aline Dutra; MUNIZ, Lúcia Sanvido; BARON, Alessandra M.; PIOVAN, Leandro; MITCHELL, David Alexander; KRIEGER, Nadia. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 13–19, 2014.

MAHESH, Sneha E.; RAMANATHAN, Anand; BEGUM, K. M. Meera S.; NARAYANAN, Anantharaman. Biodiesel production from waste cooking oil using KBr impregnated CaO as catalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 91, p. 442–450, 2015.

MAO, Donglei; ZHANG, Xingguang; ZHANG, Xiongfei; JIA, Mingmin; YAO, Jianfeng. Glucose-derived solid acids and their stability enhancement for upgrading biodiesel via esterification. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S100495411830819X>> Acesso em: 2 fev. 2019.

MARTÍNEZ-RUIZ, Antonio; TOVAR-CASTRO, Luz; SERGIO, Hugo; SAUCEDO-CASTAÑEDA, Gerardo; FAVELA-TORRES, Ernesto. Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 52–58, 2018.

MELERO, Juan A.; BAUTISTA, L. Fernando; IGLESIAS, Jose; MORALES, Gabriel; SÁNCHEZ-VAZQUEZ, Rebeca. Production of biodiesel from waste cooking oil in a continuous packed bed reactor with an agglomerated Zr-SBA-15/bentonite catalyst. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 145, p. 197–204, 2014.

MELLO, Marcia De; YOUNG, André; VILLARDI, Hugo; PESSOA, Fernando; SALGADO, Andrea. Biodiesel production by the methylic-alkaline and ethylic-enzymatic routes: Discussion of some environmental aspects. **Journal of Cleaner Production**, v. 144, p. 347–357, 2017.

MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.

MESSIAS, Josana Maria; DA COSTA, Bruna; DE LIMA, Valeria Marta Gomes; GIESE, Cristine; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas:

Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

PETERSEN, Maria Teresa Neves; FOJAN, Peter; PETERSEN, Steffen B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p.115-147, 2001.

OLIVEIRA, João Felipe G.; LUCENA, Izabelly Larissa; SABOYA, Rosana M. Alves; RODRIGUES, Marcelo L.; TORRES, Antonio Eurico B.; FERNANDES, Fabiano A. Narciso; CAVALCANTE JR., Célio L.; PARENTE JR, Expedito. José S. Biodiesel production from waste coconut oil by esterification with ethanol: The effect of water removal by adsorption. **Renewable Energy**, v. 35, 11, 2581-2584, 2010.

PAN, Hu; LI, Hu; ZHANG, Heng; WANG, Anping.; YANG, Song. Acidic ionic liquid-functionalized mesoporous melamine-formaldehyde polymer as heterogeneous catalyst for biodiesel production. **Fuel**, v. 239, p. 886–895, 2019.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119, 1999.

PERIN, E. C.; SILVA, G. V.; ASSAD, J. A. R.; VELA, D.; BUJA, L. M.; SOUSA, A. L. S.; LITOVSKI, S.; LIN, J.; VAUGHN, W. K.; COULTER, S.; FERNANDES, M. R.; WILLERSON, J. T. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, p. 486-495, 2008.

PERREUX, L.; LOUPY, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. **Tetrahedron**, 57, 9199, 2001.

PERREUX, L.; LOUPY, A. Nonthermal effects of microwave synthesis. In: Loupy A (ed) **Microwaves in organic synthesis**. Wiley-VCH Verlag GmbH, London, p. 134-218, 2006.

PRITCHARD, James; CIFTCI, Aysegul; VERHOEVEN, M. W. G. M. T.; HENSEN, Emiel J. M.; PIDKO, Evgeny A. Supported Pt-Re catalysts for the selective hydrogenation of methyl and ethyl esters to alcohols. **Catalysis Today**, v. 279, p. 10–18, 2017.

QUEIROZ, Monna Lisa B. *et al.* MICROWAVE ACTIVATION OF IMMOBILIZED LIPASE FOR TRANSESTERIFICATION OF VEGETABLE OILS. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 38, p. 303-308, 2015. Retirado de <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422015000300303&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000300303&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 12 fev. 2019.

RIBEIRO, Bernardo Dias; DE CASTRO, Aline Machado; COELHO, Maria Alice Zarur; FREIRE, Denise Maria Guimarães. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, p. 1-16, 2011.

SAIFUDDIN N.; RAZIAH, A. Z.; FARAH, H.N. Production of biodiesel from high acid value waste cooking oil using an optimized lipase enzyme/acid-catalyzed hybrid process. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, p. 485–495, 2009.

SANTOS, L.J. dos. **Produção contínua de biodiesel utilizando coluna de destilação reativa**. Dissertação (mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 2012.

SANTOS, J. M. B. dos. **Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*acrocomia aculeata*) empregando enzima livre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

SANTOS, Denisson; ELOÁ, C. L. da Rocha; SANTOS, Robson L. M.; CANCELAS, Aarón J.; FRANCESCHI, Elton; SANTOS, Alexandre F.; FORTUNY, Montserrat; DARIVA, Cláudio. Demulsification of water-in-crude oil emulsions using single mode and multimode microwave irradiation. **Separation and Purification Technology**, v. 189, p. 347–356, 2017.

SAYLOR, Benjamin D.; LOVE, John J. Demulsification of water-in-crude oil emulsions using single mode and multimode microwave irradiation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 544–552, 2016.

SILVA, J. R. P.; NURNBERG, A. J.; DA COSTA, F. P.; ZENEVICZ, M. C. P.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L. **Hidroesterificação de Gordura Abdominal de Frango Catalisada pela Lipase NS-40116. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. 2016. Disponível em: <<https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4464-enzitec2016.pdf>> Acesso em: 29 jan. 2018a.

SILVA, Jacqueline Rodrigues Pires; NÜRNBERG, Artur Jacques; DA COSTA, Felipe Pereira; ZENEVICZ, Maria Cristina; LERIN, Lindomar Alberto; ZANETTI, Micheli; VALÉRIO, Alessandra; OLIVEIRA, J. Vladimir De; NINOW, Jorge Luiz; OLIVEIRA, Débora De. Bioresource Technology Reports Lipase NS40116 as catalyst for enzymatic transesterification of abdominal chicken fat as substrate. **Bioresource Technology Reports**, p. 214–217, 2018b.

SOMNUK, Krit; SMITHMAITRIE, Pruittikorn; PRATEEPCHAIKUL, Gumpon. Two-stage continuous process of methyl ester from high free fatty acid mixed crude palm oil using static mixer coupled with high-intensity of ultrasound. **Energy Conversion and Management**, v. 75, p. 302–310, 2013.

STERGIOU, P.Y. A.; FOUKIS, H.; SKLIVANITI, P.; ZACHARAKI, L. G.; THEODOROU, M.; PAPAGIANNI. Experimental research and optimization of process variables affecting the production of extracellular hydrolases with protease, lipase and  $\alpha$ -amylase activities by *Kluyveromyces marxianus* IF0 0288 IFIB-2012. 5th international conference on industrial bioprocesses. Taipei, Taiwan, 2013.

STUERGA, D.; DELMOTTE, M. Wave-Material Interactions, Microwave Technology and Equipment. In: LOUPY, A. **Microwaves in Organic Synthesis**. 1 ed, chap 1, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.

TACCA, Cesar Augusto Andrade; CHANG, Chia-Chi; CHEN, Yi-Hung; JI, Dar-Ren; WANG, Yi-Yu; YEN, Yue-Quen.; CHANG, Ching-Yuan. Reduction of FFA in jatropha curcas oil via sequential direct-ultrasonic irradiation and dosage of methanol/sulfuric acid catalyst mixture on esterification process. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1078–1085, 2014.

TANGY, Alex; PULIDINDI, Indra Neel; PERKAS, Nina.; GEDANKEN, Aharon. Continuous flow through a microwave oven for the large-scale production of biodiesel from waste cooking oil. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 333–341, 2017.

THOSTENSON, E. T.; CHOU, T. W. Microwave processing: fundamentals and applications. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 30, p. 1055-1071, 1999.

TORRES, Sebastián; CASTRO, Guillermo R. Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 271–277, 2004.

TROMBETTONI, Valeria; LANARI, Daniela; PRINSEN, Pipjn; LUQUE, Rafael; MARROCCHI, Assunta; VACCARO, Luigi. Recent advances in sulfonated resin catalysts for efficient biodiesel and bio-derived additives production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 65, p. 136–162, 2018.

ULLAH, Zahoor; SADA, Amir; MUHAMMAD, Nawshad; ULLAH, Riaz; ALQAHTANI, Ali S.; SHAH, Syed Nasir; GHANEM, Ouahid Ben; BUSTAN, Mohamed Azmi; MAN, Zakaria. A review on ionic liquids as perspective catalysts in transesterification of different feedstock oil into biodiesel. **Journal of Molecular Liquids**, v. 266, p. 673–686, 2018.

VILLENUEVE, P.; MUDERHWA, M. J.; GRAILLE, J.; HAAS, J. M. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

XIAO, T.; SHIBATA, Y.; RAO, B.; LARIBEE, R. N.; O'ROURKE, R.; BUCK, M. J.; GREENBLATT, J. F.; KROGAN, N. J.; LIEB, J. D.; STRAHL, B. D. The RNA polymerase II kinase Ctk1 regulates positioning of a 5' histone methylation boundary along genes. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 27, p. 721-731, 2007.

XING, Qiao; SONG, Jia; YOU, Xiuhua; XU, Dongling; WANG, Kexin; SONG, Jiagi; GUO, Qin; LI, Pengyu; WU, Chuanbin; HU, Haiyan. Microemulsions containing long-chain oil ethyl oleate improve the oral bioavailability of piroxicam by increasing drug solubility and lymphatic transportation simultaneously. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 709–718, 2016.

WANG, Y.; FANG, Z.; ZHANG, F. Esterification of oleic acid to biodiesel catalyzed by a highly acidic carbonaceous catalyst. **Catalysis Today**, v. 319, p. 172–181, 2019.

YAHYA, Ahmad R. M.; ANDERSON, William A.; MOO-YOUNG, Murray. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.



YAN, Ming; ZHOU, Wei; SHU, Hau; YUSUPU, Rizwangul; MIAO, Dongxia; KRUGEL, André; KLIEGL, Reinhold. Eye movements guided by morphological structure: Evidence from the Uighur language. **Cognition**, v. 132, p. 181-215, 2014.

YU, Dahai; LI, Tian.; MA, Dongxiao; WU, Hao; WANG, Zhi; WANG, Lei; FANG, Xuexun. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. **Green Chemistry**, v. 12, p. 844–850, 2010.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M.; The effect of water on enzymatic action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.

ZHANG, J.; S. Chen.; Rui Yang.; Y. Yan. Biodiesel production from vegetable oil using heterogenous acid and alkali catalyst. **Flue**, London, v. 89, p. 2939-2944, 2010.

ZHANG, H.; DING, J.; QIU, Y.; ZHAO, Z.; Microwave assisted esterification of acidified oil from waste cooking oil by CERP/PES catalytic membrane for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 112, 28, 2012.

ZHEN, Bin; JIAO, Qingze; WU, Qin; LI, Hansheng. Catalytic performance of acidic ionic liquid-functionalized silica in biodiesel production. **Journal of Energy Chemistry**, v. 23, p. 97–104, 2014.

## APENDICES

### APENDICE 1 - TABELAS DE CONSUMO DE ÁCIDO GRAXO E ERROS EXPERIMENTAIS

Tabela 1. Valores de erros nos experimentos de conversão de ácido graxo residual, no método convencional, com distintos catalisadores.

Tempo (min)	Enzimático		Químico	
	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro
5	98,0	1,5	93,5	1,3
15	91,7	3,0	93,5	1,3
30	70,7	4,1	82,6	1,3
45	53,7	4,1	69,6	1,3
60	33,2	4,6	68,5	1,5
120	9,9	0,7	50,0	1,3
180	7,6	0,4	42,4	1,5
240	7,3	0,6	39,1	1,3

Tabela 2. Valores de erros nos experimentos de conversão de ácido graxo residual, por aquecimento micro-ondas, com distintos catalisadores.

Tempo (min)	Enzimático		Químico	
	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro
5	71,2	1,4	86,2	1,9
15	57,5	1,9	65,2	1,0
30	43,8	0,0	53,2	0,6
45	32,9	1,4	31,4	1,8
60	30,1	1,4	16,6	0,6
120	13,7	1,9	7,2	0,7

Tabela 3. Valores de erros nos experimentos de conversão de ácido graxo residual, nos métodos, convencional, micro-ondas cíclico e micro-ondas dinâmico, com catálise química.

Tempo (min)	Convencional		Dinâmico		Cíclico	
	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro
5	93,48	1,26	76,71	1,37	68,49	1,94
15	93,48	1,26	67,12	1,94	53,42	1,94
30	82,61	1,26	49,32	0	32,88	1,94
45	69,57	1,26	35,62	1,37	23,29	1,94
60	68,48	1,54	30,14	1,37	16,44	1,94
120	50,00	1,26	17,81	1,94	12,33	1,94

Tabela 4. Valores de erros nos experimentos de conversão de ácido graxo residual em micro-ondas dinâmico, com catálise química na presença de hexano.

Volume (mL)	1-Butanol		1-Hexanol		1-Octanol	
	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro
0	30,66	36,89	36,89	5,80	33,22	2,47
5ml	19,43	36,89	17,48	2,74	18,26	3,84
7,5ml	42,82	36,89	35,34	3,52	37,46	6,51

Tabela 5. Valores de erros nos experimentos de conversão de ácido graxo residual em micro-ondas dinâmico, com catálise enzimática.

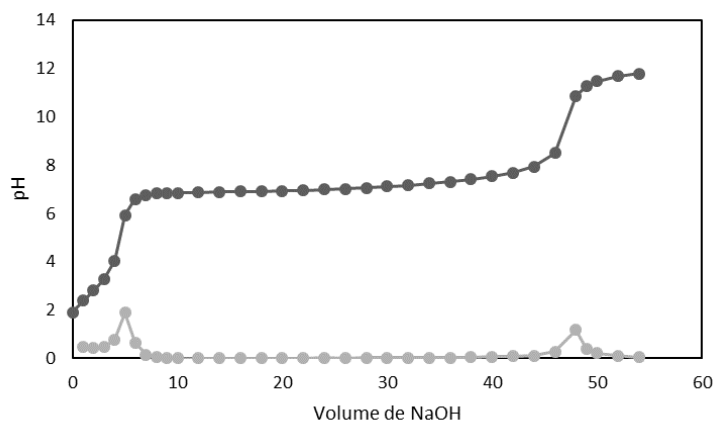
Tempo (min)	Convencional		Dinâmico	
	AR (%)	Erro	AR (%)	Erro
5	98,01	1,54	86,22	1,86
15	91,68	2,97	65,16	1,00
30	70,65	4,07	53,24	0,63
45	53,73	4,09	31,38	1,82
60	33,22	4,62	16,62	0,55
120	9,91	0,66	7,21	0,66

Tabela 6. Resultados de atividade enzimática e energia total nos experimentos em modo convencional, micro-ondas cíclico e dinâmico.

MÉTODO	TEMPO (min)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA U/g	ENERGIA TOTAL (w)
CONVENCIONAL	15	-	-
	30	1767,46	-
	60	621,00	-
	120	433,95	-
CÍCLICO	15	140,53	1280
	30	180,58	2480
	60	168,01	4320
	120	111,22	8200
DINÂMICO	15	181,95	243,4
	30	430,91	361,2
	60	250,42	673,8
	120	326,23	1278,2

## APENDICE 2 – GRÁFICOS DAS CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA PARA REAÇÕES COM CATÁLISE QUÍMICA

Figura 1 – Titulação potenciométrica, para etanol, em 5min de reação em aquecimento convencional.

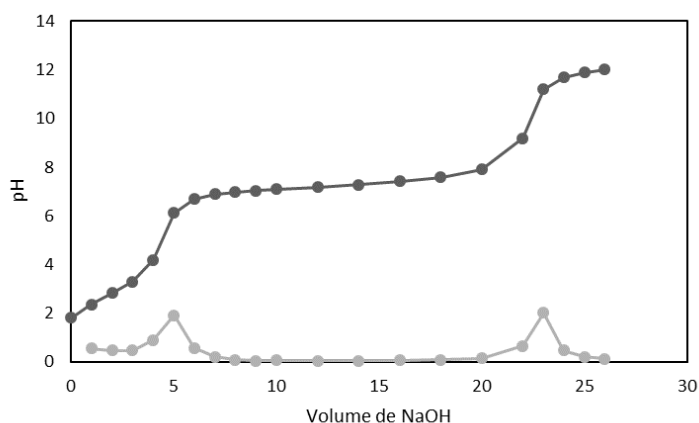


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (48 - 5)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 1720$$

Figura 2 – Titulação potenciométrica, para etanol, em 240min de reação em aquecimento convencional.

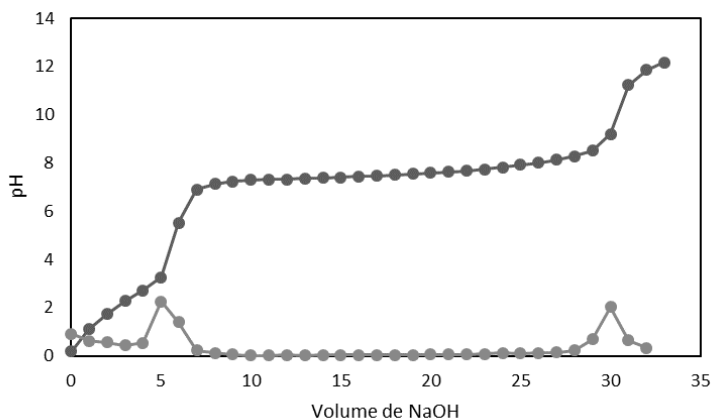


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (23 - 5)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 720$$

Figura 3 – Titulação potenciométrica, para etanol, em 5min de reação em aquecimento micro-ondas modo cíclico.

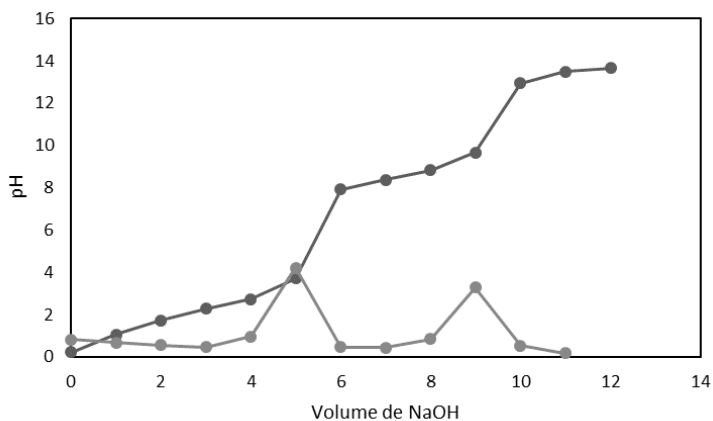


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (30 - 5)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 1000$$

Figura 4 – Titulação potenciométrica, para etanol, em 120min de reação em aquecimento micro-ondas modo cíclico.

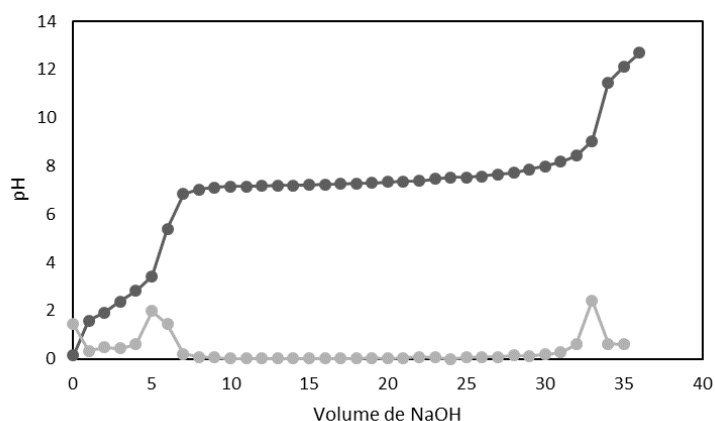


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (10 - 6)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 160$$

Figura 5 – Titulação potenciométrica, para etanol, em 5min de reação em aquecimento micro-ondas modo dinâmico.

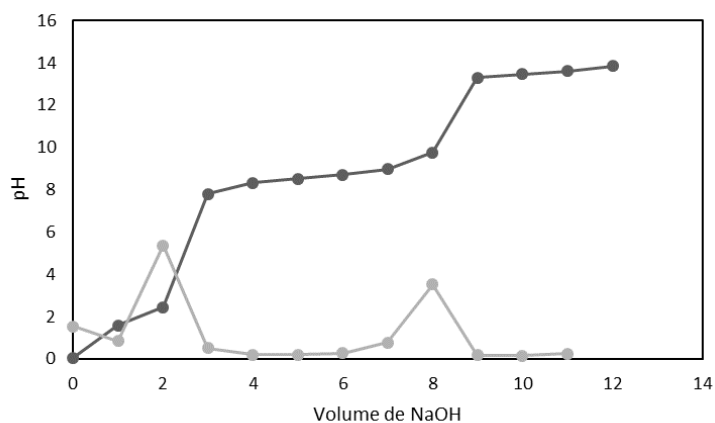


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (33 - 5)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 1120$$

Figura 6 – Titulação potenciométrica, para etanol, em 120min de reação em aquecimento micro-ondas modo dinâmico.

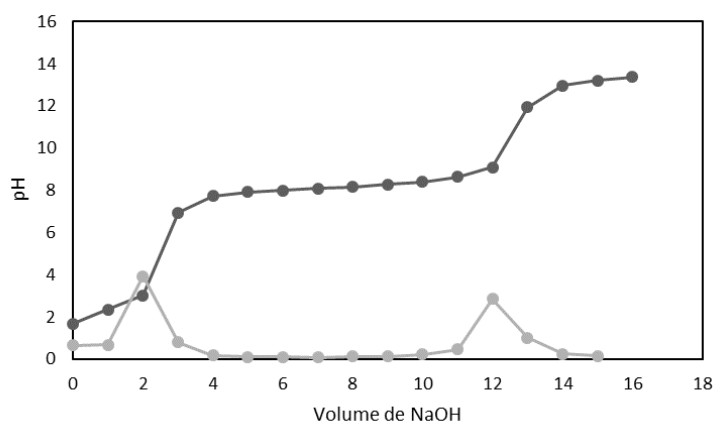


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (8 - 2)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 240$$

Figura 7 – Titulação potenciométrica, para 1-butanol, em 30min de reação em reator micro-ondas.

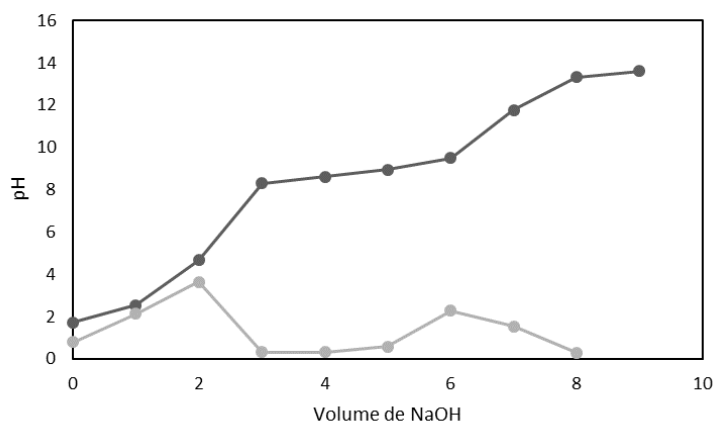


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (12 - 3)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 360$$

Figura 8 – Titulação potenciométrica, para 1-butanol, em 90min de reação em reator micro-ondas.

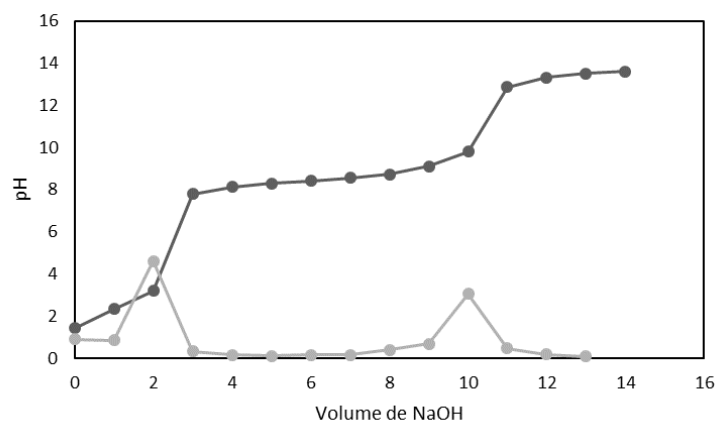


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (6 - 2)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 160$$

Figura 9 – Titulação potenciométrica, para 1-hexanol, em 30min de reação em reator micro-ondas.

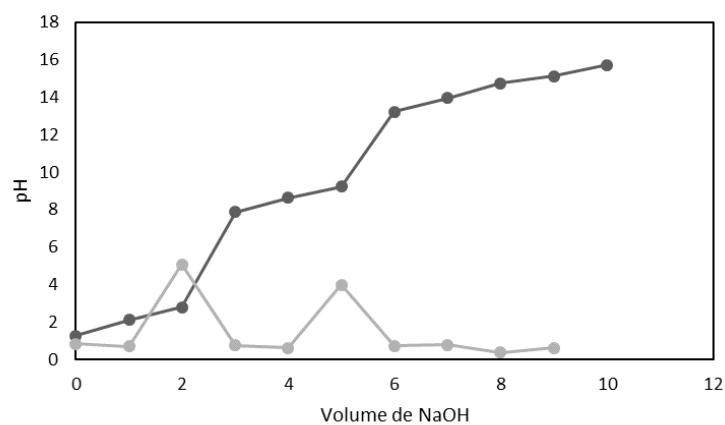


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (10 - 2)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 320$$

Figura 10 – Titulação potenciométrica, para 1-hexanol, em 90min de reação em reator micro-ondas.



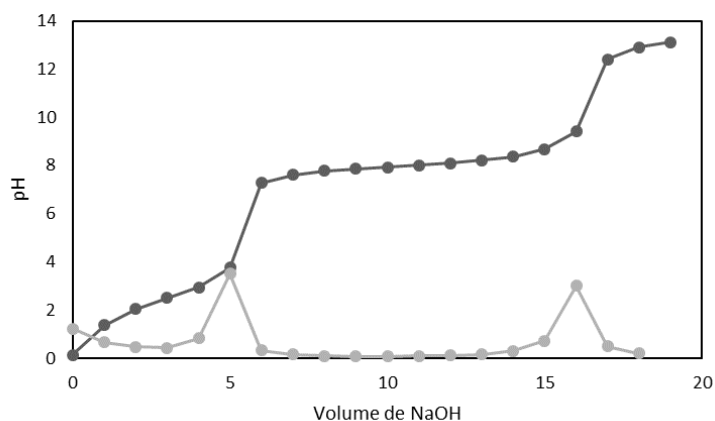
$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (5 - 2)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 120$$



Figura 11 – Titulação potenciométrica, para 1-octanol, em 30min de reação em reator micro-ondas.

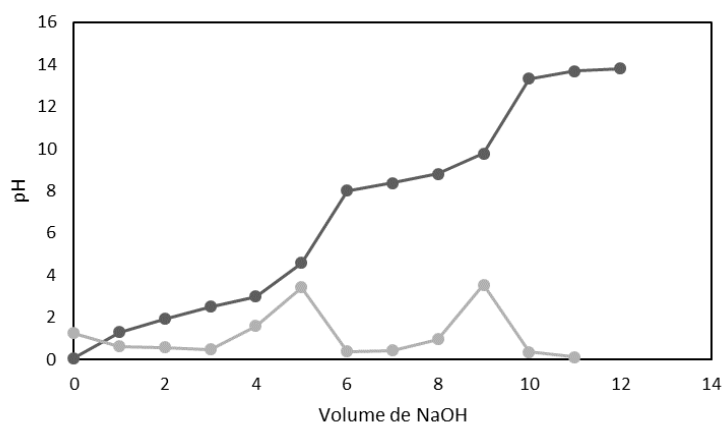


$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (16 - 5)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 440$$

Figura 12 – Titulação potenciométrica, para 1-octanol, em 90min de reação em reator micro-ondas.



$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{V_{NaOH}(mol * L^{-1}) * (V_2 - V_1)}{m_{Amostra}} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = \frac{(0,02) * (9 - 5)}{0,05} * 100$$

$$\%C_{18}H_{34}O_2 = 160$$